

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA



DOTTORATO IN BIOLOGIA AVANZATA

INDIRIZZO BIOLOGIA EVOLUTIVA

XXV CICLO

COORDINATORE Ch. Prof. Luciano Gaudio

**Ruolo della istone lisina metiltransferasi EZH2 nella
patogenesi ed evoluzione dei tumori solidi pediatrici e
delle leucemie acute**

**Tutor
Ch.mo Prof. Luciano Gaudio**

**Dottoranda
Dott.ssa Maria Ramaglia**

**Cotutor
Ch.ma Dott.ssa Velia D'Angelo**

Anno Accademico 2012/2013

*Alla mia famiglia e a mio marito,
le persone per me più importanti.....*

INDICE

INTRODUZIONE	PAG.1
CAPITOLO 1	
1.1 LE PROTEINE POLYCOMB	PAG. 3
1.2 PROTEINE POLYCOMB E CANCRO	PAG. 8
1.3 BERSAGLI DIRETTI DI EZH2 NEL CANCRO	PAG. 11
CAPITOLO 2	
2.1 TUMORE DI WILMS	PAG. 13
2.2 PRESENTAZIONE CLINICA	PAG. 15
2.3 TERAPIA	PAG. 16
2.4 PROGNOSI	PAG. 17
CAPITOLO 3	
3.1 SARCOMA DI EWING	PAG.18
3.2 PRESENTAZIONE CLINICA	PAG.21
3.3 TERAPIA	PAG.23
3.4 PROGNOSI	PAG.24
CAPITOLO 4	
SARCOMI DEI TESSUTI MOLLI	PAG.26
4.1 RABDOMIOSARCOMA	PAG.27
4.2 PRESENTAZIONE CLINICA	PAG.29
4.3 DIAGNOSI E DEFINIZIONE DELLO STADIO	PAG.31
4.4 TERAPIA	PAG.32
4.5 PROGNOSI	PAG.34
CAPITOLO 5	
5.1 LA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA DELL'ETÀ PEDIATRICA	PAG.37
5.2 GENERALITÀ	PAG.38
5.3 EZIOPATOGENESI	PAG.44
CAPITOLO 6	
OBIETTIVI	PAG.46
CAPITOLO 7	
MATERIALI E METODI	PAG.49
7.1 SEPARAZIONE DEI LINFOBLASTI	PAG.50
7.2 ESTRAZIONE DEL DNA	PAG.51
7.3 ESTRAZIONE PROTEICA	PAG.52
7.4 SAGGIO WESTERN BLOTTING	PAG.53
7.5 ESTRAZIONE DELL'RNA	PAG.56
7.6 ISOLAMENTO DELL'RNA DA TESSUTO IN PARAFFINA	PAG.57
7.7 REAZIONE DI DNASI I SULL'RNA	PAG.59
7.8 RETROTRASCRIZIONE	PAG.59
7.9 REAL TIME PCR	PAG.60
7.10 COLTURA CELLULARE	PAG.63
7.11 IMMUNOPRECIPITAZIONE CROMATINICA (CHIP)	PAG.64
CAPITOLO 8	
RISULTATI	
8.1 ANALISI QUANTITATIVA DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DI EZH2 NEI CAMPIONI DI TUMORE SOLIDO	PAG.69

8.2 ANALISI QUANTITATIVA DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DI SUZ12 NEI CAMPIONI DI TUMORE SOLIDO.....	PAG.72
8.3 ANALISI QUANTITATIVA DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DI EED NEI CAMPIONI DI TUMORE SOLIDO.....	PAG.74
8.4 ANALISI QUANTITATIVA DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DI NGFR NEI CAMPIONI DI TUMORE SOLIDO.....	PAG.76
8.5 ANALISI QUALITATIVA DELL'ESPRESSIONE DI EZH2, SUZ12 E EED NEI CAMPIONI DI TUMORE SOLIDO PEDIATRICO.....	PAG.78
8.6 ESPRESSIONE DI EZH2 E CARATTERISTICHE CLINICHE NEI TUMORI SOLDI.....	PAG.81
8.7 ESPRESSIONE DI NGFR E CARATTERISTICHE CLINICHE NEI TUMORI SOLDI.....	PAG.84
8.8 ANALISI QUANTITATIVA DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DEI MEMBRI DI PRC2 NEI CAMPIONI DI LLA.....	PAG.86
8.9 ANALISI QUALITATIVA DELL'ESPRESSIONE DI EZH2, SUZ12 E EED NEI CAMPIONI DI T-LLA.....	PAG.89
8.10 INTERAZIONE TRA EZH2 E IL GENE INK4A.....	PAG.92
 CAPITOLO 9	
DISCUSSIONE.....	PAG.95
 CAPITOLO 10	
CONCLUSIONI.....	PAG.98
BIBLIOGRAFIA.....	PAG.100

ABSTRACT

Le mutazioni genetiche sono considerate responsabili della formazione del cancro, ma oggi sta diventando sempre più chiaro che squilibri nell'epigenoma forniscono un contributo ugualmente importante nella patogenesi del cancro nell'uomo. È possibile considerare che la tolleranza e la diffusione di lesioni genetiche, che iniziano la trasformazione maligna, dipendono dalla plasticità epigenetica della cellula target e il cancro nei bambini supporta fortemente questo modello. Il complesso PRC2, responsabile della metilazione sulla lisina 27 dell'istone H3, è formato da quattro componenti: EZH2, SUZ12, EED e RbAp46/48.

L'aumento di espressione della istone lisina metiltransferasi EZH2 è stato ampiamente studiato in diversi tipi di tumori dell'adulto, che però rappresentano un'entità biologica differente dai tumori pediatrici in quanto quest'ultimi sono causati da anomalie dello sviluppo ontogenetico, hanno un'origine mesenchimale embrionale e neuro-ectodermica, e presentano un "fenotipo staminale". Pertanto l'obiettivo principale dello studio è stato analizzare il ruolo di EZH2 nella progressione, nella invasività, nella resistenza ai farmaci e nel fenotipo metastatico del tumore pediatrico. È stata eseguita l'analisi dei livelli di espressione di EZH2, SUZ12, EED e NGFR, un marker di staminalità, in 28 microbiopsie di tumori solidi (10 rabdomiosarcomi, 7 sarcomi di Ewing, 6 tumori di Wilms e 5 tumori neuroectodermici primitivi (PNET)) e 20 campioni di leucemia linfoblastica acuta (LLA) a cellule T. Inoltre è stata eseguita un'analisi di Immunoprecipitazione cromatinica (ChIP) utilizzando un anticorpo diretto contro EZH2 su linea cellulare Jurkat, e su linfoblasti isolati da pazienti pediatrici affetti da LLA, per valutare il suo controllo su INK4a, un importante regolatore del ciclo cellulare. I risultati ottenuti mostrano un aumento dei livelli di espressione di EZH2 sia nei tumori solidi pediatrici analizzati che nelle LLA di tipo T rispetto ai campioni utilizzati come controllo. Inoltre i livelli di EZH2 erano mediamente più alti nei campioni di tumore solido metastatici e nei campioni che avevano presentato recidiva di malattia. Nei campioni analizzati in cui EZH2 è risultato iperespresso, sono stati trovati livelli di NGFR molto alti rispetto al controllo. L'analisi ChIP, eseguita sulla linea cellulare Jurkat, ha evidenziato l'assenza della regione del promotore del gene INK4a presa in esame. I risultati ottenuti dai linfoblasti estratti da pazienti pediatrici affetti da LLA a cellule T hanno invece permesso di verificare la presenza della regione studiata ma non il legame di EZH2. I risultati ottenuti inducono a ritenere promettente l'utilizzo di inibitori specifici per EZH2 nel trattamento delle neoplasie pediatriche. Gli alti livelli di espressione di EZH2 e NGFR nei tumori pediatrici analizzati supportano la teoria della cellula staminale tumorale spiegando la possibile ricomparsa della neoplasia.

INTRODUZIONE

Secondo i dati dell'Aieop (Associazione italiana ematologia oncologia pediatrica), ogni anno in Italia si ammalano di tumore circa 2.100 bambini, con un incremento annuo di nuovi casi tra l'1,5 e il 2%. La neoplasia più frequente dell'età pediatrica è rappresentata dalla leucemia, il 33%, di cui il 75% è costituito da leucemie linfoblastiche acute (LLA). I tumori del sistema nervoso centrale sono il 22% e i linfomi il 12%. Altri tumori solidi sono invece molto meno frequenti nei bambini infatti il 7% sono neuroblastomi, 7% sarcomi dei tessuti molli e il 6% tumori ossei.

I tumori infantili comprendono un ampio spettro di neoplasie maligne che si differenziano per il tipo istologico, la sede di origine e l'incidenza nei gruppi di età. È importante sottolineare che le neoplasie pediatriche sono, in modo significativo, differenti dai tumori dell'adulto poiché mentre quest'ultimi hanno un'origine epiteliale e possono essere influenzati da fattori ambientali (ad esempio, il fumo e la dieta), i tumori pediatrici sono causati da anomalie dello sviluppo ontogenetico e hanno un'origine embrionale. Negli ultimi anni, grazie all'applicazione di un approccio diagnostico e terapeutico basato su protocolli comuni migliorati di anno in anno, per alcune forme tumorali come i linfomi e le leucemie, è stato possibile ottenere percentuali di sopravvivenza del 79% per le leucemie linfoblastiche acute, del 74% per i Linfomi non Hodgkin e 93% per i Linfomi di Hodgkin.

Per altre patologie le percentuali di guarigione sono purtroppo ancora basse come 30% per Rhabdomyosarcomi, 65% per gli osteosarcomi, 55% per i Sarcomi di Ewing e 60% per i tumori di Wilms con istologia sfavorevole.

Negli ultimi anni è stato evidenziato come alcune forme di tumore sono caratterizzate dalla presenza di cellule con specifiche proprietà stem-like, dette anche cellule staminali tumorali (Cancer Stem Cells/CSCs). Tali cellule possono essere considerate le cellule “inizianti” il tumore e sono probabilmente responsabili delle ricorrenze di malattia. Le CSCs hanno capacità di auto-rinnovamento, di guidare, in modo continuo, la proliferazione delle cellule maligne e la potenzialità di dare origine a una o più specie di cellule tumorali. Grazie a queste evidenze è stato possibile arrivare alla formulazione della cancer stem cell (CSC) hypothesis, secondo la quale una ristretta popolazione cellulare potrebbe sostenere la crescita del tumore e causare le recidive. Infatti nonostante la chemioterapia distrugga la maggior parte delle cellule del tessuto tumorale, potrebbe lasciarsi alle spalle un pool cellulare che seppure piccolo spiegherebbe il ripresentarsi della malattia.

La regolazione dell'espressione dei geni nelle cellule staminali embrionali è sotto il controllo di complessi multiproteici la cui alterata funzionalità potenzialmente unisce la formazione del cancro alla biologia della cellula staminale.

CAPITOLO 1

1.1 LE PROTEINE POLYCOMB

Il cancro è una malattia causata non solo da mutazioni a livello della sequenza del DNA ma anche da alterazioni epigenetiche, che non hanno effetto sulla sequenza primaria.

Il risultato di queste alterazioni è una regolazione trascrizionale aberrante che porta a un cambiamento nell'espressione di geni implicati nella proliferazione, nella sopravvivenza e nella differenziazione cellulare. Nelle cellule trasformate le alterazioni epigenetiche coinvolgono cambiamenti nella metilazione del DNA, modificazioni degli istoni e un'alterata espressione e funzione di fattori implicati nella regolazione dell'assemblaggio e rimodellamento dei nucleosomi.

Le modificazioni post-traduzionali degli istoni rappresentano un meccanismo di regolazione epigenetica che, regolando la struttura della cromatina, può modulare l'espressione genica. La metilazione del DNA è spesso associata con alcuni tipi specifici di modificazione degli istoni che in modo cooperativo possono agire per silenziare l'espressione di un gene.

La metilazione del DNA rappresenta una delle maggiori modificazioni epigenetiche nel genoma degli eucarioti superiori. Grazie agli enzimi DNA metiltransferasi (DNMT) si verifica l'aggiunta di un gruppo metilico al carbonio in posizione 5 delle citosine presenti nel dinucleotide CpG. Durante la trasformazione neoplastica il profilo di metilazione del DNA, esibito dalle cellule cancerose, risulta inverso se paragonato con quello delle cellule normali e si può osservare una ipermetilazione focalizzata nelle regioni 5' terminali di molti geni, che risultano così silenziati.

Ma la metilazione rappresenta solo una parte di un più ampio codice epigenetico che determina il potenziale trascrizionale del genoma. È noto che la più piccola unità della cromatina è rappresentata dal nucleosoma, un complesso di DNA e proteine composto da un ottamero con quattro istoni core (H2A, H2B, H3, H4) avvolto da 147-bp di DNA, in cui le code ammino-terminali degli istoni sporgono verso l'esterno e sono soggette a una serie considerevole di modificazioni covalenti quali acetilazione, metilazione, fosforilazione e ubiquitinazione che sono implicate nella regolazione della struttura cromatinica e quindi dell'espressione genica. (1)

In generale le regioni della cromatina che presentano una struttura aperta sono marcate con una iperacetilazione dell'istone H3 e H4 e metilazione della lisina 4 nell'istone H3. Al contrario le regioni silenziate presentano metilazione della lisina 9 e 27 dell'istone H3 e della lisina 20 dell'istone H4.

La metilazione a livello istonico avviene grazie alle istone metiltransferasi (HMT) e questo tipo di modificazione coinvolge un largo numero di complessi regolatori per il rimodellamento della cromatina. È noto che i fattori del gruppo Trithorax sono implicati nell'attivazione trascrizionale di geni e la loro azione è bilanciata dagli effetti opposti dei fattori del gruppo Polycomb (PcG). (2)

Il termine Polycomb inizialmente era utilizzato per riferirsi a un mutante di *Drosophila* che mostrava una impropria segmentazione del corpo.

Le proteine PcG sono state trovate in diverse famiglie di complessi multiproteici inclusi i Polycomb repressive complexes PRC1 e PRC2.

PRC2 è responsabile della metilazione sulla lisina 27 dell'istone H3, che ha un effetto di repressione dell'espressione genica, e tali residui possono essere

di- e trimetilati sul gruppo epsilon amminico espandendo la complessità del codice istonico.

PRC1, invece, catalizza la ubiquitinazione della lisina 119 dell'istone H2A e lega in modo specifico i prodotti della catalisi di PRC2.

Il complesso core di PRC2, conservato dalla *Drosophila* fino ai mammiferi, è formato da quattro componenti: EZH1/2, SUZ12, EED e RbAp46/48. (3)

La funzione più importante nella metilazione della lisina 27 dell'istone H3 viene svolta da EZH2, Enhancer of Zeste, *Drosophila*, Homologo 2, una istone lisina metiltransferasi che presenta un dominio SET il quale fornisce il sito attivo per l'attività metiltransferasica.

EZH2, per ottenere una robusta attività istone metiltransferasica, deve essere complessato con almeno due delle subunità non catalitiche, EED e SUZ12.

Nel dominio SET sia la parte C-terminale che la zona CXC (ricca in cisteine) sono richieste per l'attività metiltransferasica, mentre l' N-terminale fornisce i siti di legame per l'assemblaggio con le altre subunità.

EED, Embryonic Ectoderm Development, funziona da proteina scaffold unendo fisicamente EZH2 e gli istoni H3 mentre SUZ12, Suppressor of Zeste, è richiesto per il riconoscimento del nucleosoma e per stabilizzare EZH2. (4)

La composizione del complesso PRC1 è molto più variabile con solo due componenti core in comune, RING1A/B, insieme con BMI1, MEL18 o NSPC1.

Nei mammiferi, PRC2 ha subito delle duplicazioni infatti i vertebrati posseggono due copie di Enhancer of Zeste, EZH1 e EZH2, che hanno differenti pattern di espressione. EZH1 è presente nelle cellule differenziate mentre EZH2 si trova nelle cellule in attiva divisione.

Comunque i complessi PRC2-EZH1 hanno una più bassa attività metiltransferasica paragonata ai complessi PRC2-EZH2; ciò potrebbe indicare che PRC2-EZH2 stabilisca i livelli cellulari di H3K27me2/3 mentre PRC2-EZH1 ripristina le H3K27me2/3 che eventualmente sono andate perse in seguito a modificazioni degli istoni o per azione di demetilasi.

Il ruolo cruciale svolto da EZH2 è dimostrato dal fatto che topi *Ezh2*-null muoiono in utero, mentre topi *Ezh1*-null non hanno difetti evidenti, probabilmente grazie alla funzione compensatoria di *Ezh2*. Comunque EZH1 può in parte compensare EZH2 poiché la perdita di entrambi provoca conseguenze maggiori che la perdita solo di EZH2. (5) Oltre alle quattro componenti del core, il complesso PRC2 presenta altri fattori: AEBP2 (proteina zing finger interagisce con molti componenti di PRC2 perché ne aumenta l'attività enzimatica), PCLs (varie funzioni: dalla regolazione dell'attività enzimatica di PRC2 al reclutamento di PRC2 sui suoi geni target) e JARID2 (migliora l'attività di PRC2 sotto definite condizioni biochimiche). Tali fattori non sono strettamente necessari per l'attività di PRC2 *in vitro* quindi si può ipotizzare che PRC2 funzioni come un oloenzima e che il contributo di ogni suo componente aggiuntivo sia richiesto per la sua massima attività. I componenti del complesso PRC2 oltre ad avere una localizzazione nucleare, sono stati identificati anche nel citoplasma delle cellule di topo e uomo e l'attività metiltransferasica è stata implicata nel controllo della polimerizzazione dell'actina.

A differenza delle PRE (Polycomb response elements) identificate in *Drosophila*, nei mammiferi non è chiaro come venga reclutato il complesso PRC2. Le sequenze target di PRC2 sono ricche in C+G ma esse da sole non identificano un elemento di risposta. (Figura A)

Nei mammiferi è stato suggerito un ruolo importante per YY1 nel reclutamento di PRC2, ma anche i ncRNA potrebbero essere coinvolti in tale processo. (3)

Alle proteine Polycomb (PcG) sono state assegnate una moltitudine di funzioni che vanno dalla differenziazione allo sviluppo del tumore fino alle decisioni che riguardano il destino di una cellula staminale.

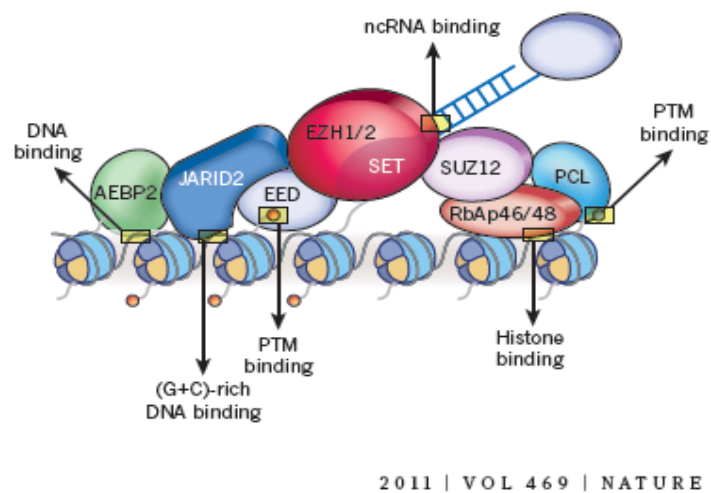


Fig. A Interazioni del complesso PRC2 con la cromatina

1.2 PROTEINE POLYCOMB E CANCRO

Tra le numerose funzioni svolte dalle proteine Polycomb, il silenziamento a lungo termine dei geni nelle cellule staminali embrionali è, attualmente, tra i più studiati. L'alterata regolazione di tali complessi unisce potenzialmente la formazione del cancro alla biologia della cellula staminale.(6)

Le "cellule staminali tumorali" presentano molte proprietà in comune con le normali cellule staminali e sono state definite come un sottogruppo di auto-sostentamento cellulare con la capacità esclusiva di mantenere il tumore. Riguardo la loro origine controversa, sono state formulate due teorie: esse potrebbero derivare da una cellula staminale normale che una serie di mutazioni genetiche potrebbero aver reso neoplastica; oppure derivare da una cellula tumorale differenziata che attraverso ulteriori alterazioni genetiche è diventata indifferenziata acquisendo le caratteristiche della cellula staminale.

Numerosi studi indicano il ruolo di EZH2 nel mantenere l'auto-rinnovamento in cellule staminali sia embrionali che adulte. Uno studio ha dimostrato come un significativo gruppo di geni bersaglio del complesso PRC2 nel tumore alla prostata, sono target di tale complesso anche nelle cellule staminali embrionali.(7)

Un comune pathway di espressione tra i geni bersaglio di PRC2 e di Oct4/Sox2/Nanog, ha ulteriormente evidenziato il legame presente tra cellule tumorali umane scarsamente differenziate e cellule staminali embrionali.(8)

L'overespressione di EZH2 è stata collegata anche all'inizio e alla progressione del cancro. Durante l'oncogenesi, uno stato cromatinico plastico potrebbe convertirsi ad uno stato di silenziamento permanente attraverso la metilazione del DNA o le modificazioni istoniche mediate dalle proteine Polycomb. Poiché l'espressione di EZH2 è attesa essere bassa nelle cellule dei

tessuti differenziati, la sua maggiore espressione potrebbe rinforzare o promuovere uno stato aggressivo stem cell-like. Inoltre tumori in stadio avanzato presentano un alto contenuto di cellule staminali tumorali ed è stato proposto che una popolazione di progenitori cellulari più aggressivi con le caratteristiche delle cellule staminali tumorali potrebbero derivare da cellule staminali tumorali primarie che acquisendo mutazioni genetiche addizionali, hanno creato un squilibrio tra cellule staminali tumorali e progenitori cellulari e hanno guidato la progressione del cancro.(7)

Uno studio condotto su tumore alla mammella ha evidenziato ulteriormente che EZH2 contribuisce non solo alla formazione delle cancer stem cell ma anche all' espansione di una popolazione più aggressiva di cellule con caratteristiche staminali che promuovono la progressione del cancro. Il meccanismo analizzato ha mostrato che EZH2 regola negativamente i meccanismi di riparo al DNA e ciò porta a mutazioni nel gene RAF1 che promuove il pathway RAF1-ERK- β -caterin e l'espansione delle BTICs (breast tumor- initiating cells) nelle forme più gravi di tumore al seno. Questi risultati rivelano che il trial clinico AZD6244, un farmaco che inibisce RAF1-ERK, potrebbe essere efficace la progressione del cancro al seno eliminando le BTICs .(9)

L' aumentata espressione di EZH2 è stata osservata in numerose forme di cancro e l'aumento più significativo era presente nelle fasi più avanzate della malattia e nei pazienti con la prognosi peggiore.(10,11)

Nel tumore alla prostata la perdita di EZH2 inibisce la crescita delle cellule cancerose in cui è stata identificata una maggiore presenza di EZH2 anche a livello citoplasmatico e ciò potrebbe avere effetti sulle caratteristiche del citoscheletro, sulla migrazione e invasività delle cellule tumorali; infatti in

seguito a knock-down di EZH2 è possibile osservare una forte riduzione delle metastasi nel caso del tumore alla prostata. (12,13,14)

Esistono numerose evidenze che indicano come EZH2 possa essere regolato in differenti tipi di tumore.

L' espressione di EZH2 può essere attivata dalla proteina di fusione EWS-FLI1 nel Sarcoma di Ewing e ciò ha un ruolo chiave nel differenziamento endoteliale/neuroectodermale e nella crescita del tumore.(15)

Anche l'ipossia può controllare l' espressione di EZH2 attraverso un HIF response elements (HRE) presente nel promotore di EZH2. In un microambiente in condizioni di ipossia, l'espressione di EZH2 aumenta promuovendo la proliferazione delle cellule inizianti il tumore.(9)

L'inattivazione dell' oncosoppressore RUNX3 attraverso l' ipermetilazione del DNA è stata riportata in vari tipi di cancro come il tumore alla prostata, al polmone e al pancreas. È stato osservato che riducendo l' espressione di EZH2 in linee cellulari di cancro alla mammella, era possibile ottenere il recupero dell' espressione di RUNX3.(16)

1.3 BERSAGLI DIRETTI DI EZH2 NEL CANCRO

Vari studi hanno mostrato come EZH2 contribuisce a controllare diversi aspetti del cancro regolando una miriade di geni target.

EZH2 reprime trascrizionalmente il soppressore del ciclo cellulare INK-ARF guidando la progressione del ciclo cellulare, prevenendo la senescenza e l'esaurimento delle cancer stem cells.(17)

Inoltre EZH2 promuove la tumorigenicità del glioma reprimendo l'espressione di BMP Receptor1-Beta (BMPR1B).(18)

EZH2 favorisce la transizione epiteliale-mesenchimale , un processo associato con la progressione del cancro e la formazione di metastasi, interagendo con il fattore trascrizionale SNAIL1 e sopprimendo l'espressione del marcatore epiteliale E-cadherin (CDH1).(19)

Attraverso il silenziamento epigenetico di DAB2IP (Disable Homolog2-Interacting Protein), innesca direttamente la formazione di metastasi attivando Ras e NF- κ B che promuove inizio e la formazione di metastasi nel tumore alla prostata.(20)

Inoltre EZH2 è coinvolto nel promuovere angiogenesi tumorale infatti è stato mostrato che VEGF, attraverso i fattori trascrizionali E2F1/3, aumenta l'espressione di EZH2 che reprime regolatori negative dell'angiogenesi quali Vasohibin 1 (VASH1), e di conseguenza favorisce l'angiogenesi.(21)

Uno studio condotto su sarcoma di Ewing ha evidenziato che il blocco dell'espressione di EZH2 determinava una riduzione dell'espressione di geni della staminalità quali nerve growth factor receptor (NGFR), mentre geni del differenziamento endoteliale e neuroectodermali come ALCAM, GAP43, in seguito al silenziamento di EZH2 venivano espressi nuovamente.(22)

Insieme questi studi indicano che EZH2 ha un ruolo essenziale e multi sfaccettato nel cancro. Bloccare l' espressione di EZH2 o la sua attività sembra rappresentare una strategia promettente per il trattamento specifico di cellule tumorali, cellule endoteliali tumorali e cellule staminali tumorali.

CAPITOLO 2

2.1 TUMORE DI WILMS

Il tumore di Wilms è una neoplasia renale di tipo embrionario che costituisce il più frequente tumore maligno del tratto genito-urinario in età pediatrica. La sua incidenza è pari a 5,5-7,2 nuovi casi per anno/1.000.000 di soggetti d'età inferiore a 15 anni, senza differenze tra i due sessi. La fascia d'età più colpita è tra il primo e il quinto anno di vita (77%), con un picco a 2-3 anni e nel 5% circa dei casi la neoplasia è bilaterale.(23)

Il tumore di Wilms può presentarsi sia in forma ereditaria (1-2% dei casi) che sporadica. La prima, a trasmissione autosomica dominante a penetranza variabile, si evidenzia più precocemente rispetto a quella non ereditaria; può essere bilaterale o multifocale ed essere associata ad anomalie congenite.

Si è formulata l'ipotesi che per lo sviluppo del tumore di Wilms siano necessarie due mutazioni: nella maggior parte dei tumori sporadici unilaterali entrambe le mutazioni sono somatiche, mentre nelle forme familiari e bilaterali si presuppone che la prima mutazione sia germinale. La patogenesi del tumore di Wilms è basata, quindi, sulla perdita di un gene funzionante, secondaria alla mutazione di loci omologhi. La caratterizzazione citogenetica sia delle cellule somatiche che tumorali ha identificato tale gene nella banda p13 del cromosoma 11; sebbene le cellule somatiche nella maggior parte dei pazienti abbiano un cariotipo normale, quelli con aniridia hanno spesso una delezione 11p13, o un valore dimezzato dell'enzima catalasi, codificato nella medesima regione del cromosoma 11. Altre alterazioni citogenetiche documentate nei pazienti affetti da tumore di Wilms sono rappresentate dalla trisomia 13 e 18.

Sotto il profilo anatomico-patologico il tumore di Wilms si presenta, nella maggioranza dei casi, come lesione unifocale localizzata centralmente o ad un polo renale, a volte con sostituzione dell'intero organo e con notevole deformazione di esso. Più raramente la neoplasia è multifocale o bilaterale all'esordio o lo diventa in fasi successive. Macroscopicamente si presenta come una massa rotondeggiante, ben demarcata da una pseudo capsula intrarenale composta di tessuto renale compresso e atrofico, di consistenza soffice, friabile, con aree emorragiche e necrotiche.

Sotto il profilo istologico il tumore di Wilms è un tumore misto, che ricorda le strutture del metanefro e del mesoderma da cui prende origine. Grande importanza prognostica ha la suddivisione dei sottotipi istologici nelle categorie "istologia sfavorevole" e "istologia favorevole" definite secondo i criteri del National Wilms' Tumor Study (NWTs).

A "istologia sfavorevole" sono considerati i tumori di Wilms di tipo epiteliale, blastema toso e misto in cui sia presente anaplasia focale (< 10%) o diffusa (>10%). L'anaplasia viene definita in rapporto alla presenza dei seguenti parametri: aumento del diametro del nucleo (oltre tre volte la norma), ipercromasia nucleare, mitosi bizzarre; è sufficiente che uno o pochi foci tumorali contengano aree di anaplasia per prevedere un'evoluzione pessima, con tassi di ricaduta pari al 43% e 90% rispettivamente nei casi di anaplasia focale e diffusa. I tumori di Wilms ad "istologia favorevole" comprendono i tipi epiteliale, blastema toso e misto in cui non sia presente anaplasia. In tale categoria sono comprese altre entità a connotazione morfologica distinta, a comportamento biologico benigno, che possono essere considerate varianti del tumore di Wilms, quali la cisti multi oculare, il nefroma meroblastico congenito, il tumore rabdomiosarcomatoso e la nefroblastosi. Vanno invece

riconosciute come neoplasie renali distinte il “Sarcoma a cellule chiare del rene” e il “Tumore rabdoide del rene” entrambe tra le più maligne nella popolazione pediatrica e un tempo considerate come varianti del tumore di Wilms.(24)

2.2 Presentazione clinica

La sintomatologia non è caratteristica e la diagnosi è in genere fortuita nel corso di un controllo medico. Nel 20-30% dei casi l'esordio è caratterizzato dalla presenza di sangue nelle urine e da sintomi aspecifici quali stipsi, anoressia, febbre, vaghi dolori addominali. In una piccola percentuale dei casi l'esordio può avvenire con un quadro di addome acuto dovuto alla rottura spontanea o traumatica del tumore che porta ad un rapido ingrossamento dell'addome, anemia, ipotensione e febbre. La diagnosi differenziale deve prendere in considerazione le malattie che si manifestano con una massa addominale, tra cui principalmente il neuroblastoma, ma anche idronefrosi, il rene policistico, la splenomegalia, i linfomi addominali, la cisti mesenterica, il carcinoma renale.

Il parenchima polmonare rappresenta la sede più frequente di metastasi ematogene, cui seguono l'intensamento dei linfonodi regionali, del fegato (15% dei casi) e più raramente del sistema nervoso centrale e dello scheletro.

L'estensione della neoplasia alla diagnosi rappresenta uno dei fattori prognostici più importanti, condizionando tempi e modalità dell'approccio terapeutico. Tra i vari sistemi classificativi proposti il più seguito è quello elaborato dal National Wilms' Tumor Study secondo il quale lo stadio della neoplasia viene definito dal chirurgo e confermato da patologo.

Stadio I: tumore limitato al rene; asportazione completa.

Stadio II: tumore esteso oltre il rene con infiltrazione del grasso perirenale, dei vasi renali, delle pelvi e dell'uretere, del surrene.

Stadio III: tumore esteso ad organi (escluso il surrene) e/o strutture extraurinarie, senza metastasi ematogene.

Stadio IV: presenza di metastasi ematogene

Stadio V: tumore renale bilaterale.

2.3 Terapia

Il programma terapeutico è pianificato in rapporto allo stadio della malattia e al tipo istologico utilizzando in modo variamente combinato chirurgia, radioterapia e chemioterapia.

L' exeresi totale del rene interessato costituisce non solo un accertamento diagnostico, ma il primo e fondamentale momento terapeutico. La radioterapia in passato era impiegata prima dell'intervento chirurgico nei casi in cui la massa era considerata non asportabile, con lo scopo di modificare l'estensione della neoplasia e rendere più agevole asportazione chirurgica, ma recentemente a tale scopo viene utilizzata la chemioterapia preoperatoria.

La radioterapia postoperatoria viene eseguita solo nei pazienti in III e IV stadio con istologia favorevole e in tutti i pazienti con istologia sfavorevole, ad eccezione di quelli I stadio.

La chemioterapia costituisce il trattamento cardine e prioritario: contribuisce al controllo locale della malattia, sterilizza foci metastatici subclinici già presenti alla diagnosi e induce il controllo di metastasi clinicamente evidenti.

Una condizione particolare è costituita dal tumore di Wilms bilaterale in cui la strategia terapeutica più moderna attribuisce maggiore rilevanza alla chemioterapia e rinviando la chirurgia al più tardi possibile. La percentuale di sopravvivenza è comunque elevata (87% a 5 anni) e ciò è attribuibile alla concomitanza di una serie di fattori clinico-biologici positivi che si riscontrano in questi pazienti: età inferiore a 2 anni, istologia favorevole e malattia focale in ciascun rene.

2.4 Prognosi

Il tumore di Wilms è l' esempio più eclatante dei progressi ottenuti in oncologia pediatrica, utilizzando una strategia terapeutica multidisciplinare. Infatti la percentuale di sopravvivenza globale libera da malattia a 4 anni è passata dal 15-30%, con la sola terapia chirurgica, all'83% ottenuta con un approccio combinato chirurgico e radio chemioterapico.

I fattori prognostici più importanti capaci di influenzare negativamente l'outcome della malattia sono rappresentati dallo stadio e in particolare dalla presenza alla diagnosi di metastasi ematogene, dal tipo istologico sfavorevole e dall'interessamento linfonodale. Accanto a questi fattori "maggiori" se ne riconoscono altri di minore rilevanza quali il peso della neoplasia (>250g), età superiore a 2 anni, rottura intraoperatoria del tumore, invasione dei vasi extrarenali, estensione del tumore in cavità addominale. Facendo riferimento al tipo istologico, è stato constatato che nei pazienti con istologia favorevole in stadio I, II, III, IV la sopravvivenza a 4 anni è risultata rispettivamente pari al 97,4%, 94,9%, 90,9% e 86,6%. Nei pazienti con istologia sfavorevole in stadi I-III la sopravvivenza a 4 anni è risultata pari al 68,4%, mentre in quelli in IV stadio pari al 58%.(24)

CAPITOLO 3

3.1 SARCOMA DI EWING

Il sarcoma di Ewing si presenta in genere come un tumore indifferenziato dell'osso, ma può originare anche dai tessuti molli (sarcoma di Ewing extraosseo) ed una sua variante più differenziata, nota come tumore neuroectodermico periferico primitivo (PPNET), può insorgere sia nell'osso che nei tessuti molli. Per questo è più corretto parlare di tumori della “famiglia del sarcoma di Ewing” che comprende il sarcoma di Ewing dell'osso, il sarcoma di Ewing extraosseo e il tumore neuroectodermico periferico primitivo.

Queste neoplasie sono più frequenti nella seconda (64%) e nella prima decade di vita (27%), più raramente nella terza (9%) ed eccezionali in fasi successive.

Il sesso maschile appare più colpito del sesso femminile, così come la razza bianca rispetto la nera.

Dal punto di vista citogenetico sia il sarcoma di Ewing osseo ed extraosseo che il PPNET presentano una caratteristica traslocazione reciproca $t(11;22)(q24;q12)$, che coinvolge uno specifico punto di rottura differente da quello interessato nella traslocazione $t(11;22)$.

Tale anomalia citogenetica suggerisce l'ipotesi di un'origine comune per sarcoma di Ewing e il PPNET ed è stata proposta come marker nella diagnosi differenziale con altri tumori a piccole cellule rotonde, specialmente il neuroblastoma.

L'origine istogenetica del sarcoma di Ewing è stata oggetto di numerose discussioni e l'ipotesi più attuale e prevalente è che sia il sarcoma di Ewing che il PPNET prendano origine dai neuroni colinergici parasimpatici

postgangliari diffusi in tutte le regioni dell'organismo. Tuttavia il fatto che il sarcoma di Ewing sia stato definito dal punto di vista morfologico come un tumore a cellule primitive senza differenziazione e il PPNET come una neoplasia con differenziazione neurale e che esistano forme tumorali con caratteristiche morfologiche intermedie, suggerisce che il sarcoma di Ewing e il PPNET siano agli estremi di uno spettro di entità biologiche. Il significato clinico della distinzione morfologica non è completamente noto, sebbene ci sia evidenza di una prognosi peggiore per i soggetti affetti dalle neoplasie con maggiore differenziazione neurale. La classificazione anatomico-patologica include il sarcoma di Ewing "tipico", "atipico" e il PPNET. Il termine PPNET è utilizzato per descrivere tumori primitivi a cellule rotonde dei tessuti molli e dell'osso con aspetti neuro-ectodermici, una categoria di neoplasie che comprende il tumore maligno a piccole cellule della regione toracopolmonare che origina dai nervi intercostali. Le caratteristiche istologiche strutturali dei diversi tumori appartenenti alla famiglia del sarcoma di Ewing sono riportate nella tabella I. La diagnosi differenziale tra le singole forme istologiche e gli altri tumori a piccole cellule rotonde è possibile sia mediante l' esame morfologico, che tramite le tecniche di immunohistochimica.(24)

Tab I. Caratteristiche morfologiche del sarcoma di Ewing

	Sarcoma di Ewing		PPNET
Microscopio ottico	Tipico	atipico	
Aspetto	Tappeto di cellule	“nidi” di cellule	Vere rosette di cellule
Matrice cellulare	Assente	Usualmente presente	presente
Dimensioni cellulari	Piccole	Piccole/grandi	Piccole/grandi
Forma cellulare	Esclusivamente rotonda	Prevalentemente e rotonda	Prevalentemente rotonda
Citoplasma	scarso	Da scarso a moderatamente presente	Facilmente identificabile
Nucleo	rotondo	Rotondo, occasionalment e ovale	Rotondo, occasionalmente ovale
Mitosi	< 1-2/ campo alto ingrandimento	>1-2/ campo alto ingrandimento	>1-2/ campo alto ingrandimento

3.2 Presentazione clinica

La malattia viene diagnosticata in fase localizzata circa nell'80% dei casi; i distretti ossei più colpiti sono rappresentati dagli arti (53%) e dalle ossa dell'asse scheletrico centrale: pelvi (45%), parete toracica (34%), colonna vertebrale (12%), testa e collo (9%). I PPNET sono generalmente localizzati a livello dell'asse scheletrico centrale (74%), preferibilmente vicino alla parete toracica (60%); il sarcoma di Ewing extraosseo è localizzato agli arti in oltre un terzo dei casi.

Il *dolore* è il sintomo che quasi costantemente rivela la presenza del tumore ed è spesso accompagnato da tumefazioni del segmento colpito e dei tessuti molli circostanti.

La concomitante presenza di febbre, leucocitosi, anemia ed aumento della velocità di eritrosedimentazione insieme alla possibilità di una transitoria regressione della sintomatologia, spontanea o indotta da antibiotico terapia, possono erroneamente indirizzare la diagnosi verso una osteomieliti. Il periodo tra l' inizio dei sintomi e la diagnosi è estremamente variabile, da poche settimane a diversi mesi, a causa della frequente intermittenza della sintomatologia dolorosa che induce una falsa rassicurazione sia nel paziente che nel medico.

La sintomatologia è strettamente correlata alla sede del tumore: le localizzazioni vertebrali si rendono evidenti con sintomatologia dolorosa del rachide a irradiazione radicolare accompagnata o meno da disturbi sfinterici o motori; quelle costali con una sindrome respiratoria; quelle pelviche con sintomi compressivi a carico della vescica e/o del retto o con dolore alle gambe per interessamento dei nervi periferici; quelle mandibolari con parestesie della cute del labbro inferiore e del mento. L' elevata incidenza di

metastasi a distanza (80%) rilevata in epoca prechemioterapica ha suggerito l'ipotesi che la maggior parte dei pazienti affetti dalla famiglia del sarcoma di Ewing presenti metastasi microscopiche alla diagnosi. Le metastasi sono clinicamente evidenziabili alla diagnosi nel 20% dei pazienti affetti da sarcoma di Ewing, nel 30% dei soggetti affetti da PPNET e nel 15% dei pazienti affetti da sarcoma di Ewing extraosseo.

La via di disseminazione è quella ematogena per cui le localizzazioni più frequenti sono polmone (38%), osso (31%) e midollo osseo (11%); il rachide è una delle sedi ossee metastatiche elettive; rara (<5%) la localizzazione al Sistema Nervoso centrale. Le neoplasie della parete toracica diffondono allo spazio pleurico adiacente e cellule neoplastiche sono rilevabili nel liquido pleurico. Il sarcoma di Ewing extraosseo può disseminare in sede intra-addominale: al fegato, al peritoneo o al tratto gastrointestinale.

Posto il sospetto di sarcoma di Ewing si procederà all'esecuzione della biopsia del segmento colpito e quindi alla determinazione dell'estensione della malattia attraverso un accurato staging clinico, che si avvale di accertamenti clinico-strumentali e di laboratorio. E' indispensabile eseguire in tutti i pazienti la radiografia del torace e la scintigrafia ossea in quanto le più frequenti sedi di metastatizzazione sono rappresentate dal polmone e dallo scheletro.

3.3 Terapia

La strategia terapeutica ottimale del sarcoma di Ewing è multidisciplinare e prevede l' eradicazione della lesione primaria con rimozione chirurgica e/o radioterapia ad alte dosi, associata a combinazioni chemioterapiche.

L' intervento chirurgico viene attuato in tutti i casi in cui sia possibile effettuare una resezione radicale della neoplasia determinando danni funzionali inferiori o uguali a quelli che comporterebbe il trattamento radiante. In presenza di particolari localizzazioni la cui escissione non comporta un grave danno funzionale (costa, clavicola, scapola, fibula, piccole ossa della mano o del piede, ala iliaca, sacro distale, radio prossimale, ulna distale), trova indicazione l' intervento chirurgico di asportazione.

L' intervento demolitivo di amputazione è invece indicato in prima istanza quando siano interessati i segmenti distali degli arti in bambini di età inferiore a 6 anni, nei quali la terapia radiante comporterebbe comunque severi ed irreversibili danni sull'accrescimento.

Il sarcoma di Ewing è un tumore estremamente radiosensibile, ma richiede dosi elevate per questo il ruolo della radioterapia è stato posto in secondo piano rispetto alla chirurgia, trovando indicazione quando l' intervento chirurgico è impossibile o mutilante o non radicale.

Prima dell'adozione della chemioterapia adiuvante la sopravvivenza dei pazienti affetti da neoplasie appartenenti alla famiglia del sarcoma di Ewing era pari al 10% a 5 anni. L' avvento della chemioterapia adiuvante, attuata in concomitanza o dopo il trattamento della lesione iniziale, ha significativamente modificato la prognosi, migliorando non solo la sopravvivenza, ma anche il controllo locale della neoplasia. Più recentemente è stato introdotto l' impiego della chemioterapia preoperatoria neoadiuvante,

che dovrebbe consentire di trattare precocemente la “malattia microscopica”, di ridurre la lesione iniziale e di rendere minore l’incidenza di fratture patologiche, fenomeno frequente dopo la radioterapia.

Il trattamento dei PPNET è analogo a quello del sarcoma di Ewing, mentre il sarcoma di Ewing extraosseo viene sottoposto agli schemi terapeutici chemio-radioterapici previsti per il rabdomiosarcoma. Nei pazienti refrattari o recidivati o in casi selezionati a prognosi estremamente severa, si può ricorrere al trapianto di midollo osseo autologo o all’utilizzo di cellule staminali periferiche come “rescue” midollare dopo una opportuna chemioterapia sub massimale ablativa.

3.4 Prognosi

L’assenza o la presenza di metastasi all’esordio di malattia rappresenta il fattore prognostico più importante, determinando una variazione nelle percentuali di sopravvivenza a lungo termine dal 50-70% a meno del 30%.
(23)

Nelle forme localizzate la sede primaria influenza la prognosi in modo considerevole: infatti i pazienti con malattia localizzata alle estremità presentano una percentuale di sopravvivenza più elevata rispetto a quelli con forme localizzate al tronco (sopravvivenza a 2 anni: 92 vs 30%). Le lesioni della pelvi sembrano avere una prognosi peggiore rispetto a quelle prossimali degli arti e altrettanto queste rispetto a quelle distali. La prognosi è inoltre influenzata negativamente dalle grandi dimensioni tumorali, da una scarsa risposta alla terapia e da elevati livelli di lattato deidrogenasi sierica. In linea generale con l’applicazione dei più recenti protocolli chemio-radioterapici le

percentuali di sopravvivenza a 3-5 anni registrate nelle diverse istituzioni sono del 55-70%, in quanto permane alta l'incidenza di meta statizzazione durante trattamento, nonché di ricaduta, soprattutto nei 3 anni successivi alla sospensione della terapia.

Meno confortanti rimangono i risultati ottenuti nei pazienti con metastasi già presenti alla diagnosi (14-35%): la percentuale di guarigione è infatti ancora inferiore al 20%. Estremamente infausta, infine, la prognosi dei soggetti recidivati, la cui durata di sopravvivenza dipende dalla sede e dall'aggressività della neoplasia, dal tipo di trattamento effettuato e dal momento della ricaduta.(24)

CAPITOLO 4

SARCOMI DEI TESSUTI MOLLI

I sarcomi dei tessuti molli costituiscono un gruppo eterogeneo di neoplasie maligne derivanti dalle cellule mesenchimali primordiali che normalmente danno origine al tessuto muscolare, cartilagineo, osseo e fibroso.

I sarcomi dei tessuti molli presentano un'incidenza pari a 11 nuovi casi per anno/1.000.000 di soggetti di età inferiore a 15 anni e costituiscono la sesta neoplasia più comune dopo le leucemie acute, i tumori del sistema nervoso centrale, i linfomi, il neuroblastoma e il tumore di Wilms.

Nonostante la diversa istogenesi i sarcomi dei tessuti molli sono accomunati da alcune caratteristiche biologiche quali:

- infiltrazione diffusa dei tessuti circostanti;
- tendenza alla recidiva locale, anche quando l'exeresi chirurgica appare radicale;
- disseminazione frequente per via ematogena e rara per via linfatica.

Il rabdomiosarcoma è il più frequente sarcoma dei tessuti molli, costituendo circa il 5-8% delle neoplasie dell'età pediatrica, ed insieme ai sarcomi indifferenziati rappresenta oltre il 50% circa dell'intero gruppo; più rari risultano gli altri istotipi quali fibrosarcoma, liposarcoma, leiomiosarcoma, sarcoma sinoviale, angiosarcoma, emangiopericitoma, sarcoma neurogenico.

I sarcomi indifferenziati sono costituiti da elementi d'origine mesodermica così immaturi che risulta difficile identificarne la natura istologica.(24)

4.1 RABDOMIOSARCOMA

Il rabdomiosarcoma (RMS) è una neoplasia che caratteristicamente prende origine dal tessuto muscolare striato, ma che talora può insorgere anche in tessuti mesenchimali in cui le fibre muscolari striate siano assenti, come ad esempio la parete vescicale.

L'incidenza è stimata pari a 3,7-5 nuovi casi/anno/1.000.000 di bambini con età < 15 anni. Colpisce tutte le età, tuttavia circa il 70% delle lesioni compare prima dei 10 anni con due picchi di incidenza: il primo, più marcato, tra 2 e 5 anni ed il secondo nel periodo puberale, tra 11 e 15 anni.(23)

Esistono interessanti ed inspiegabili associazioni tra sede primaria, età e istologia: i sarcomi della vescica e della vagina si riscontrano principalmente nel primo anno di vita ed istologicamente sono di tipo embrionale o botriode; i sarcomi del tronco e delle estremità si manifestano in età più avanzata e presentano istologia alveolare o indifferenziata; infine quelli della testa e del collo possono insorgere in qualsiasi periodo dell'infanzia, ma più frequentemente nei primi 8 anni e non presentano un caratteristico sottotipo istologico. Il sesso maschile appare modestamente più colpito dalla neoplasia: M:F = 1,4:1 .

Il quadro istologico nella maggior parte dei casi è di difficile connotazione, soprattutto quando si tratta del sottotipo embrionale o alveolare. Esistono poi alcune peculiarità in rapporto all'istotipo: il rabdomiosarcoma botriode è una neoplasia quasi esclusiva della prima infanzia e rappresenta una variante del sottotipo embrionale; il rabdomiosarcoma pleomorfo (tipo adulto), invece, è una forma estremamente rara in età pediatrica. Nella tabella II sono mostrati i

sottotipi istologici del rabdomiosarcoma e la correlazione con età, sede primaria e frequenza di comparsa.

TAB. II Correlazione tra sottotipo istologico e sede primaria

Sottotipo istologico	Sede primaria	Frequenza relativa (%)	Età (anni)
RMS embrionale	Testa e collo tratto genito-urinario	57	3-12
RMS botrioide	Vescica, vagina, nasofaringe	6	0-3 4-8
RMS alveolare	Estremità, tronco	19	6-21
S. indifferenziato	Estremità, tronco	10	6-21
Altri	Estremità, tronco	8	6-21

Talvolta la diagnosi istologica non è agevole e richiede l' esecuzione di indagini immunoistochimiche che si avvalgono di anticorpi monoclonali diretti contro proteine muscolo-specifiche (miosina, mioglobina, creatinchinasi, actina, desmina, proteine della banda Z). Gli anticorpi anti-desmina e anti-actina muscolo specifiche si sono rivelati gli strumenti diagnostici più utili ed affidabili. La microscopia elettronica rappresenta un altro mezzo diagnostico di estrema affidabilità specialmente per valutare il grado di differenziamento del tessuto neoplastico.

4.2 Presentazione clinica

Il rabdomiosarcoma può insorgere in qualsiasi muscolo scheletrico; il segno rivelatore più caratteristico è rappresentato dal riscontro di una massa che condiziona il quadro clinico. Segni e sintomi specifici sono in rapporto alla sede primaria e al tipo di disseminazione della neoplasia primitiva.

La testa e il collo rappresentano le tipiche sedi d'esordio della malattia (40% dei casi): nel 25% dei casi il rabdomiosarcoma si localizza a livello orbitario, nel 50% circa in altre sedi parameningee, nel rimanente 25% sono interessati: cuoio capelluto, viso, mucosa orale, orofaringe, laringe e collo. I tumori del collo generalmente si manifestano con raucedine, disfagia e tumefazione a carico dei tessuti molli. I rabdomiosarcomi del nasofaringe, dei seni paranasali e dell'orecchio medio causano ostruzione nasale, sinusite, epistassi, disfagia e talvolta possono invadere per contiguità il sistema nervoso centrale determinando paralisi dei nervi cranici, meningismo e difficoltà respiratoria per infiltrazione del tronco cerebrale; cefalea, vomito e segni di ipertensione cerebrale suggeriscono una crescita intracranica della neoplasia dopo erosione dell'osso della base cranica, con tendenza alla disseminazione a distanza, prevalentemente a livello scheletrico e polmonare.

I tumori localizzati all'orbita producono esoftalmo, deficit dei movimenti extraoculari, tumefazione palpebrale, diminuzione del visus. I sarcomi non parameningei tendono ad accrescersi in modo indolore, rimanendo localizzati.

L'interessamento del tratto genito-urinario si realizza nel 20% dei casi. Il tumore più frequentemente si localizza alla vescica e alla prostata oltre a utero, vagina, testicolo e regione paratesticolare. La sintomatologia comprende disturbi minzionali ed ematuria nelle localizzazioni vescico-

prostatiche. I sarcomi del tratto genito-urinario, come quelli della testa e del collo, raramente presentano un'istologia di tipo alveolare.

Le localizzazioni al tronco e alle estremità rappresentano il 10-20% di tutti i casi di rabdomiosarcoma: manifestano la tendenza a recidivare localmente nonostante le ampie asportazioni e a disseminare a distanza. I sarcomi delle estremità si manifestano con una tumefazione, talvolta dolente ed arrossata e linfoadenomegalia satellitare, più frequentemente presenti nelle forme ad istologia alveolare.

I rabdomiosarcomi intratoracici, retro peritoneali e pelvici raggiungono notevoli dimensioni prima di determinare evidenti manifestazioni cliniche (disturbi respiratori, dolori addominale, occlusione intestinale, oliguria o idronefrosi) e spesso si presentano con estesa diffusione locale.

Localizzazioni meno abituali sono rappresentate dalle regioni perineale e perianale e dalle vie biliari; eccezionalmente possono essere interessati fegato, cervello, trachea, cuore ed ovario.

Circa il 20-30% dei casi presenta metastasi alla diagnosi; le sedi più frequenti sono risultate polmone e sistema nervoso centrale (37%), linfonodi (35%), ossa (25%), fegato (16%), tessuti molli (9%), midollo osseo (7%).

La diagnosi differenziale deve prendere in considerazione, in rapporto alla sede, le numerose condizioni tumorali benigne e maligne e processi infiammatori; gli esami strumentali orientano i sospetti diagnostici, ma sarà l'esame istologico a stabilire l'esatta natura della neoformazione. Va inoltre ricordato che nell'ambito dei tumori a piccole cellule rotonde (rabdomiosarcoma, neuroblastoma, linfoma non-Hodgkin, sarcoma di Ewing extra-osseo, osteosarcoma a piccole cellule, ecc.) non è sempre facile pervenire ad una diagnosi istologica sicura nonostante l'applicazione di metodiche

istopatologiche più sofisticate e precise quali la microscopia elettronica e l'immunoistochimica.

4.3 Diagnosi e definizione dello stadio

Il prelievo biotico nella sede della lesione è l'unico mezzo per formulare la diagnosi e stabilire il sottotipo istologico. L'esatta definizione dello stadio si fonda su una serie di esami clinico-strumentali e di laboratorio che si diversificano in rapporto alla sede primaria della neoplasia. Il sistema di stadiazione in gruppi clinici utilizzato dall'Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica è quello proposto dall'IRS, che si basa su criteri anatomico-patologici e sull'entità dell'exeresi chirurgica. L'intervento chirurgico rappresenta la procedura essenziale per stabilire il gruppo clinico; i margini chirurgici di resezione devono essere accuratamente esaminati dal patologo per valutare la radicalità dell'intervento: il riscontro di residui macro o microscopici condiziona l'appartenenza a un gruppo specifico e conseguentemente la scelta del programma terapeutico. Tale sistema di stadiazione si è dimostrato strettamente correlato alla durata della remissione e alla sopravvivenza (Tabella III).

**TAB. III Classificazione in gruppi clinici proposta dall'IRS
(Intergroup Rhabdomyosarcoma Study)**

Gruppo I	Tumore localizzato, completamente asportato, con conferma istologica (linfonodi regionali non infiltrati dal tumore).
Gruppo II	Tumore macroscopicamente asportato, ma con residui microscopici (il patologo trova il tumore ai margini della resezione)
Gruppo III	Tumore non completamente asportato o solo biopsiato, con residui macroscopici
Gruppo IV	Tumore con metastasi presenti alla diagnosi

L'Unione Internazionale contro il Cancro (UICC), l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) congiuntamente alla SIOP hanno da tempo adottato la stadiazione TNM che, fondandosi essenzialmente su criteri clinici, prende in considerazione l' invasività loco-regionale del tumore (T) e la presenza o meno di interessamento dei linfonodi regionali (N) o di metastasi a distanza (M) al momento della diagnosi.

4.4 Terapia

La strategia terapeutica del rhabdomyosarcoma è abitualmente multidisciplinare. L'utilizzazione diversificata dei vari presidi terapeutici dipende dalla sede primaria della malattia, dalla estensione e dal sottotipo istologico del tumore. Nel corso degli anni l'efficacia della terapia adiuvante ha modificato l'approccio chirurgico: al concetto di radicalità ad ogni costo si è sostituito quello di una chirurgia di tipo conservativo.

La chirurgia deve tendere alla exeresi completa della neoformazione primaria, unitamente ad una generoso asportazione di tessuto sano circostante. Tale radicalità è realizzabile, in genere, nelle lesioni del tronco e delle estremità, mentre nei tumori dell'orbita, delle pelvi e dei seni paranasali non è possibile operare una resezione totale senza causare gravi mutilazioni. In questi casi si ricorre ad un approccio chirurgico di tipo conservativo associato alla radio e chemioterapia. È indispensabile effettuare la biopsia di qualsiasi linfonodo che appaia sospetto clinicamente o radiologicamente. Un "second look" chirurgico è previsto nelle neoplasie inoperabili all'esordio ed è raccomandato entro le prime 20 settimane dall'inizio del trattamento chemioterapico; tale intervento può permettere l' exeresi completa del residuo tumorale e consente

inoltre una più attendibile valutazione della risposta chemioterapica iniziale, grazie all'analisi istologica del tessuto residuo.

L'obiettivo principale del trattamento radiante è quello di assicurare un soddisfacente controllo locale del tumore riducendo al massimo la morbidità, sia acuta che a distanza, in pazienti sottoposti a chemioterapia intensiva. Il trattamento radiante viene personalizzato in rapporto all'età, alla sede, alle dimensioni del tumore e al gruppo clinico; solo i pazienti con tumore primitivo localizzato completamente asportato non necessitano di tale modalità terapeutica.

La chemioterapia rappresenta il trattamento cardine e deve essere utilizzata in tutti i pazienti, indipendentemente dallo stadio; l'adozione sistematica di combinazioni polichemioterapiche, in associazione alla chirurgia e alla radioterapia, ha comportato un notevole incremento della percentuale di sopravvivenza libera da malattia.

Le prospettive terapeutiche future sono riposte nell'utilizzazione internazionale di una stadiazione clinica prognosticamente più predittiva rispetto a quella attualmente adottata (stadiazione TNM), nella attribuzione di un maggior valore alle caratteristiche biologiche della malattia, nell'identificazione di approcci chemioterapici più aggressivi e nell'identificazione di tempi e dosi ottimali della radioterapia.

4.5 Prognosi

L' estensione della malattia all'esordio, la sede primaria, l'istologia, la risposta al trattamento sono stati identificati come gli indicatori prognostici che influenzano più significativamente la sopravvivenza.

In merito all'estensione della massa tumorale all'esordio (stadio di malattia) vanno considerati come fattori prognostici i seguenti elementi anatomico-clinici: dimensione iniziale del tumore, invasione delle strutture adiacenti, interessamento dei linfonodi regionali, presenza o meno di metastasi a distanza come indicato dalla stadi azione TNM. La taglia (T) della neoplasia alla diagnosi appare capace di influenzare la prognosi della malattia: tumori con dimensioni superiori a 5 cm hanno un decorso clinico nettamente più sfavorevole rispetto a quelli con dimensioni inferiori. La grandezza della neoplasia inoltre sembra essere strettamente correlata con l' invasività della malattia stessa. Per quanto concerne l'importanza prognostica dell'interessamento dei linfonodi regionali (N), i dati relativi all'esperienza SIOP non avvalorano l'ipotesi che la compromissione della stazioni linfatiche loco-regionali rappresenti un fattore prognostico negativo. La presenza di metastasi (M) invece appare compromettere drasticamente le possibilità di guarigione: solamente il 20% dei pazienti con malattia metastatica sopravvive a 6 anni dalla diagnosi, mentre decisamente superiori appaiono le aspettative di vita di pazienti con rabdomiosarcoma non metastatico (sopravvivenza pari al 68%). Nell'ambito poi del gruppo di pazienti con malattia non metastatica, quelli con tumore confinato all'organo o al tessuto d'origine mostrano un'evoluzione clinica significativamente migliore rispetto quella di soggetti con tumore coinvolgente gli organi e le strutture contigue (sopravvivenza a 6 anni: 78% vs 54%). In definitiva, la classificazione TNM appare di notevole

interesse clinico e di estrema utilità prognostico-terapeutica. Va inoltre ricordato che siccome i pazienti in II e III stadio presentano un andamento clinico sovrapponibile, per semplicità potrebbero essere accomunati in uno stesso gruppo prognostico, così che si verrebbero a riconoscere solo tre stadi TNM: I, II-III e IV.

L'evoluzione clinica è in stretto rapporto con la sede di insorgenza del tumore. La sede primaria condiziona la comparsa di segni e di sintomi che possono condurre ad una diagnosi più o meno rapida: i tumori localizzati in sedi profonde (regione retro peritoneale o intratoracica) si presentano alla diagnosi più estesi e disseminati rispetto ai sarcomi superficiali. La localizzazione iniziale influenza inoltre la via di disseminazione, linfatica o ematogena, e condiziona l'atteggiamento terapeutico. L'impossibilità ad eseguire un intervento chirurgico radicale per la presenza nella sede tumorale di strutture vitali non sacrificabili rende la malattia prognosticamente sfavorevole. Per quanto riguarda le singole sedi, pazienti con tumore localizzato all'orbita, al tratto genitourinario, in sede parameningea, alla testa e al collo sono considerati a prognosi favorevole; a prognosi sfavorevole sono invece i pazienti con tumore primario al tronco e alle estremità; i rabdomiosarcomi retro peritoneali presentano in assoluto la prognosi più sfavorevole.

Il sottotipo istologico del tumore rappresenta un altro fattore prognostico importante: i rabdomiosarcomi di tipo alveolare ed i sarcomi indifferenziati hanno una prognosi peggiore rispetto al sottotipo embrionale. Esistono controversie in merito all'importanza prognostica del binomio sede-istologia, specialmente per quanto riguarda il rabdomiosarcoma alveolare: infatti i pazienti con localizzazione alle estremità presentano una cattiva prognosi

sebbene solo la metà di questi soggetti abbia un rabdomiosarcoma alveolare.

Il valore prognostico della sede primaria si è dimostrato superiore a quello del sottotipo istologico.

Il fattore prognostico più significativo è rappresentato dalla risposta alla terapia: il rabdomiosarcoma scarsamente responsivo alla chemioterapia ha una prognosi infausta; la risposta precoce e completa al trattamento è correlata invece con una buona prognosi.

Sulla prognosi influiscono infine gli effetti collaterali a lungo termine relativi al trattamento adottato, il cui peso non grava sulla percentuale di sopravvivenza, bensì sulla qualità della vita. La combinazione chemio-radioterapica produce severe fibrosi e limitazioni funzionali delle aree irradiate, oltre a determinare danni gonadici e sterilità, e tende ad incrementare il rischio di neoplasie secondarie, prevalentemente leucemie mieloidi e tumori solidi.(24)

CAPITOLO 5

5.1 LA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA DELL'ETÀ PEDIATRICA

La leucemia linfoblastica acuta (LLA) rappresenta una malattia linfoproliferativa caratterizzata da una proliferazione incontrollata dei precursori midollari della linea linfoide e dall'accumulo di elementi indifferenziati, che, tuttavia, conservano ancora caratteristiche morfologiche ed immunologiche tipiche della linea linfoide. La malattia sfocia in una progressiva sostituzione delle cellule normali con blasti leucemici, fino a giungere ad una condizione di insufficienza midollare quando il parenchima midollare viene completamente sostituito dalle cellule blastiche. Le stesse cellule blastiche si possono riscontrare anche nel sangue periferico.(25,26)

5.2 Generalità

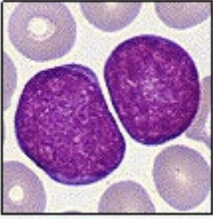


Le leucemie linfoblastiche acute costituiscono circa il 75% (27) delle leucemie dell'età pediatrica ed il rapporto maschi/femmine è pari a 4:1. L'incidenza annuale è di circa 39,3 nuovi casi /1.000.000 di soggetti di età inferiore ai 15 anni, il picco di incidenza si registra nella fascia di età compresa tra 2 e 5 anni, con una percentuale di sopravvivenza globale pari all'80%. (26,27)

In base a criteri citomorfologici, citochimici, al fenotipo immunologico espresso dalle cellule leucemiche, alla citogenetica e alla caratterizzazione biomolecolare è possibile suddividere le LLA in diversi sottotipi.

Sulla base della citomorfologia, la classificazione FAB (Franco-Americana-Britannica) del 1976 (28) distingue tra le LLA tre gruppi (Tabella IV):

- **L1**, caratterizzato da cellule di piccole dimensioni, a nucleo rotondeggiante, cromatina nucleare dispersa, nucleoli poco evidenti, citoplasma scarso e poco basofilo; le forme L1 comprendono l'85% dei casi di LLA pediatrica.
- **L2**, caratterizzate da cellule morfologicamente eterogenee, a nucleo irregolare, cromatina finemente dispersa o addensata grossolanamente, con uno o più nucleoli, citoplasma basofilo a volte scarso, a volte abbondante.
- **L3**, o tipo Burkitt, caratterizzata da grosse cellule rotondeggianti con nucleo regolare, cromatina addensata omogeneamente, nucleoli ben evidenti, citoplasma abbondante, basofilo e con presenza di vacuoli.(28)

TAB. IV - Caratteristiche morfologiche dei sottotipi di LLA

CLASSIFICAZIONE FAB	LLA L1	LLA L2	LLA L3
			
Taglia cellulare	Principalmente Piccola	Grande e variabile	Grande e poco variabile
Cromatina nucleare	Piuttosto omogenea, in alcune cellule può essere addensata	Variabile	Finemente retinata, omogenea
Forma del nucleo	Di solito regolare	Irregolare, sono frequenti fessure e indentazioni	Regolare; ovale o rotonda
Nucleoli	Non visibili o invisibili e di difficile individuazione	Ugualmente visibili, spesso grandi	Usualmente cospicui
Quantità di citoplasma	Scarso	Variabile, spesso abbondante	Moderatamente abbondante
Basofilia citoplasmatica	Da leggera a moderata	Variabile	Forte
Vacuoli citoplasmatici	Variabili	Variabili	Prominenti

Dal punto di vista citochimico è possibile differenziare le LLA per la negatività alle reazioni della perossidasi e del Sudan nero B, generalmente positive nelle leucemie mieliodi acute (LMA); può essere presente una PAS positività di aspetto granulare nelle L1 e nelle L2 e, nelle forme T, una positività per la fosfatasi acida, la alfa-naftilacetato esterasi e la beta-glicuronidasi.

L'individuazione del fenotipo immunologico, possibile grazie all'impiego di anticorpi monoclonali, differenzia le leucemie linfatiche acute in pre-pre B, Common LLA (cALLA), pre-B, B matura e T. Le leucemie della linea B sono le più frequenti nel bambino, 80-85% del totale (Tabella V).

TAB.V - Classificazione immunofenotipica delle LLA

Immunofenotipo	pre-pre-B	common LLA	pre-B	B maturo	T
Caratteristiche Antigeniche	CD19± (CD22) HLA-DR TdT	CD19 (CD22) CD10 CD24 HLA-DR TdT	CD19 (CD22) CD10 CD24 CIgM HLA-DR TdT±	CD19 CD22 CD24 SmIg HLA-DR	TdT CD7 (CD3) CD5 CD2 CD1 CD4 CD8

La proliferazione dei blasti nel midollo osseo impedisce la crescita delle normali linee cellulari, infatti i sintomi caratteristici della malattia sono legati proprio al deficit dei vari costituenti la popolazione midollare: serie eritroide, mieloide e megacariocitaria. È possibile avanzare l'ipotesi diagnostica di leucemia quando si riscontra la presenza di cellule blastiche nello striscio di sangue periferico ma l'esame morfologico dell'aspirato midollare e/o della biopsia osteo-midollare sono le indagini decisive e necessarie per la diagnosi, associate alla classificazione immunofenotipica, alla immunoistochimica ed alla citogenetica, che permettono di formulare anche la prognosi e di programmare il percorso terapeutico più idoneo. La diagnosi di leucemia è chiara e conclamata allorquando il numero di blasti nello striscio di sangue midollare supera il 25%.

La prognosi della LLA infantile nell'ultimo ventennio ha subito un concreto miglioramento grazie alle strategie terapeutiche impiegate sulla base della valutazione dei fattori di rischio presenti alla diagnosi.(26)

L'Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica (AIEOP), in accordo con i vari gruppi internazionali, ha elaborato nel corso degli anni

protocolli terapeutici diversificati in rapporto alle fasce di rischio individuate nella popolazione di bambini affetti da LLA .

Gli elementi clinico-biologici presenti all'esordio della malattia considerati attualmente come fattori prognostici sono: l'**età**, la **conta leucocitaria**, le **caratteristiche cliniche**, le **anomalie citogenetiche**, il **fenotipo immunologico**, la **citomorfologia**, il **sex** e la **risposta alla pre-fase cortisonica**, ed alla **terapia di induzione alla remissione**:

Età: Bambini di età compresa tra 2 e 10 anni presentano la prognosi migliore, mentre risultati terapeutici più deludenti si sono registrati nei bambini di età inferiore ai 12 mesi e superiore a 10 anni, soprattutto in quelli con meno di 6 mesi di vita. I pazienti con più di 10 anni di età presentano un rischio di recidiva doppio rispetto a quelli di età inferiore. Nel lattante la prognosi sfavorevole è da attribuire all'alta incidenza di forme indifferenziate e di leucemie ibride e all'elevata percentuale di localizzazioni neurologiche.

Leucociti: la prognosi è inversamente correlata al numero di leucociti alla diagnosi. Una conta di leucociti maggiore di 20.000/mm³ o superiore ai 50.000 individua i pazienti ritenuti a rischio medio ed alto. Le forme iperleucocitose, con leucociti > 100.000/mm³, si riscontrano più frequentemente in bambini di età inferiore ad un anno e si associano abitualmente a segni di localizzazione extramidollare, ad organomegalia, ad immunofenotipo T e ad un numero di cromosomi inferiore a 50.

Citogenetica: le anomalie citogenetiche costituiscono un fattore prognostico *indipendente*, che influenza sia la risposta alla terapia che la durata della remissione. L'iperdiploidia, con un numero di cromosomi tra 47 e 50, si associa ad altri fattori prognostici positivi e condiziona una

evoluzione favorevole della malattia, qualora non siano presenti traslocazioni. La pseudodiploidia e la ipodiploidia predicono una scarsa risposta terapeutica. Le alterazioni del cariotipo più frequentemente riscontrate sono le traslocazioni, le più specifiche, associate ad una prognosi negativa, sono: t(9;22) cr Ph+; t(4;11)MLL/AF-4; la t(8;14)(q24;q32) (Tabella VI).(24)

TAB. VI - Anomalie cromosomiche strutturali nella LLA

Immunofenotipo	Anomalia cromosomica	Geni interessati
LLA della linea B	t(4;11)(q21;q23)	IL-3, IgH
	t(5;14)(q31;q32)	
LLA a cellule pre-B	t(1;19)(q23;p13)	prl, E2A
LLA a cellule B	t(8;14)(q24;q32)	c-myc, IgH
	t(2;8)(p11;q24)	c-myc, Igk
	t(8;22)(q24;q11)	c-myc, Igλ
LLA a cellule T	t(11;14)(p13;q11)	tcl-2, TRCa
	t(1;14)(p34;q11)	TCRa
	t(8;14)(q24;q11)	c-myc, TCRa
	t(10;14)(q24;q11)	tcl-3, TCRa
	t(1;14)(p32;q11)	TCRa
	t(14;14)(q11;q32)	TCRa
	t(7;9)(q35-36;q34)	TCRb
	t(7;14)(q35-36;q11)	TCRb
	t(7;7)(p15;q11)	TCRg
	t(7;14)(p15;q11)	TCRg
	inv(14)(q11;q32)	TCRa
	inv(14)(q11;q32)	tcl-1, TCRa
Variabile	t(9;22)(q34;q11)	c-abl, bcr
	del 9(p21;22)	if-a, if-b1

Nota: IL-3: interleuchina 3; Ig H, K, λ: immunoglobulina pesante, catene leggere k e λ, TCR a,b,g: geni a,b,g per i recettori delle T-cell; bcr: regione del cluster breakpoint; if-a, b1: geni a, b1 dell'interferone.

Immunofenotipo: Il fenotipo immunologico risulta essere una variabile *dipendente*, in quanto spesso è correlato ad altri fattori come l'età e la conta leucocitaria. Nel bambino le LLA esprimenti l'antigene CALLA (common) costituiscono un sottogruppo a prognosi favorevole. Le leucemie a cellule T e quelle a cellule B mature sono associate frequentemente ad evoluzione sfavorevole. Le forme definite ibride, cioè a doppia espressione antigenica mieloide e linfoide, fanno, infine, registrare una prognosi peggiore rispetto a quelle esclusivamente linfoidi.

Citomorfolgia FAB: sebbene la morfologia rivesta un valore prognostico limitato, nei bambini le forme L1 hanno prognosi migliore rispetto a quelle L2, mentre le leucemie L3 sono caratterizzate da un andamento rapidamente e drammaticamente sfavorevole.

Sesso: i soggetti di sesso maschile presentano una prognosi peggiore rispetto a quelli di sesso femminile, legata oltre al rischio della recidiva testicolare, spesso tardiva, anche alla più frequente incidenza di leucemia a cellule T.

Risposta alla pre-fase cortisonica: rappresenta la risposta precoce alla prima fase del trattamento di induzione. Nella prefase, i pazienti che, dopo sette giorni di terapia cortisonica con prednisone, presentano una conta di blasti $< 1.000/\text{mmc}$ nel sangue periferico vengono considerati “good prednisone responders” (PGR), e sono quelli che avranno un miglior “outcome”, quelli invece che presentano una conta di cellule blastiche ≥ 1.000 vengono considerati “poor prednisone responders” (PPR).

Risposta al 33°giorno di terapia di induzione: la rapidità di citoriduzione ed il tempo per conseguire la remissione sono parametri predittivi della più

lunga durata della remissione e della sopravvivenza, il punto di cut off è stabilito sui 33 giorni.(23)

Interessamento d'organo: l'interessamento del sistema nervoso centrale alla diagnosi, presente in circa il 2-5% dei bambini con LLA, è stato ritenuto in passato un fattore prognostico sfavorevole. L'infiltrazione testicolare, presente a livello istologico in circa il 25% dei casi, è clinicamente evidente nell'1-2% dei bambini alla diagnosi di LLA. L'interessamento mediastinico alla diagnosi, frequente nelle T-LLA, ha significato prognostico sfavorevole non indipendente. Infine, l'ingrossamento importante degli organi ipocondriaci e la linfadenopatia possono essere considerati fattori prognostici negativi, in quanto riflettono la massa tumorale.(24)

5.3 Eziopatogenesi

L'eziologia permane tuttora sconosciuta; sebbene siano note numerose condizioni predisponenti. Come per altri tipi di neoplasie, anche per le leucemie è possibile che entrino in gioco meccanismi eziopatogenetici multifattoriali che rendono necessaria un'analisi complessa volta a caratterizzare non solo i singoli fattori di rischio isolatamente, ma soprattutto le possibili interazioni tra gli stessi. Inoltre numerose osservazioni confermano il ruolo fondamentale di fattori genetici ambientali e virali.(29,30,31) Si ipotizza che la LLA abbia un'origine clonale, sarebbe cioè una conseguenza della trasformazione maligna di un singolo precursore linfoide. Le basi molecolari di tale trasformazione sono più complesse di quanto si ritenesse in passato; essa potrebbe essere il risultato di una singola mutazione ma con maggiore probabilità è legata ad

eventi mutazionali multipli. L'analisi citogenetica, condotta sulle cellule leucemiche, mette in evidenza anomalie cromosomiche clonali (numeriche e strutturali) in circa l'80-90% dei casi. Nel 40-50% dei pazienti si riscontra iperdiploidia (tra 47 e 50 o >50 cromosomi), mentre un' ipodiploidia (35-45 cromosomi) è rara. Nel 40% dei casi è riscontrato un assetto pseudodiploide con alterazioni cromosomiche strutturali: traslocazioni, inserzioni, delezioni.(32,33)

Gli effetti del riarrangiamento genico prodotto dalle traslocazione sono intimamente correlati con il riarrangiamento e la regolazione dei protooncogeni cellulari. Questi giocano un ruolo nella normale crescita e sviluppo cellulare, regolando proliferazione e differenziazione delle cellule; una loro anomala espressione sarebbe in grado di determinare incremento della proliferazione cellulare, riduzione della differenziazione ed alterazione dei normali meccanismi di controllo della morte cellulare programmata (apoptosi).

CAPITOLO 6

OBIETTIVI

Comunemente le mutazioni genetiche sono considerate responsabili della formazione del cancro, ma oggi sta diventando sempre più chiaro che squilibri nell'epigenoma forniscono un contributo ugualmente importante nella patogenesi del cancro nell'uomo.

Il ruolo svolto dalla istone lisina metiltransferasi, EZH2, nella formazione e nella progressione del cancro è stato ampiamente studiato in diversi tipi di tumori dell'adulto, nei quali sono stati ottenuti risultati di notevole interesse.

Gli alti livelli di espressione di EZH2 associati con diversi aspetti nei tumori, hanno indotto la ricerca di molecole che in modo indiretto, con DZNep che determina la degradazione del complesso PRC2, o diretto, GSK126 (34), possano bloccare la sua attività metiltransferasica ed essere quindi potenzialmente utilizzati nel trattamento delle neoplasie che presentano tali alterazioni.

È possibile considerare che la tolleranza e la diffusione di lesioni genetiche, che iniziano la trasformazione maligna, dipendono dalla plasticità epigenetica della cellula target. Il cancro nei bambini supporta fortemente questo modello essendo, in modo significativo, differente dal tumore dell'adulto. Mentre quest'ultimo ha un'origine epiteliale e può essere influenzato da fattori ambientali (ad esempio, il fumo e la dieta), i tumori pediatrici sono causati da anomalie dello sviluppo ontogenetico, hanno un'origine embrionale e sono dovuti a "poche mutazioni genetiche". Pertanto l'obiettivo principale dello

studio è stato analizzare il ruolo di EZH2 nella progressione, nella invasività, nella resistenza ai farmaci e nel fenotipo metastatico del tumore pediatrico.

In particolare i tumori solidi pediatrici, con la loro origine mesenchimale embrionale e neuro-ectodermica, di cui NGFR è considerato un marker essenziale, presentano quello che viene definito un “fenotipo staminale” e costituiscono ancora un gruppo di neoplasie con bassa sopravvivenza libera da malattia.

Nelle leucemie linfoblastiche acute, anche se 80% di esse guarisce, esiste un sottogruppo ad alto rischio che presenta una forte chemioresistenza oltre che un’alta probabilità di ricorrenza della malattia.

I dati presenti in letteratura circa il coinvolgimento di EZH2 nei tumori dell’età pediatrica sono ancora scarsi pertanto un’analisi condotta in questo senso potrebbe fornire delle motivazioni convincenti per utilizzare in futuro una terapia di tipo epigenetico.

Lo studio si è articolato nei seguenti punti:

studio su tumori primitivi

1. analisi dei livelli di espressione di EZH2, SUZ12 e EED in 28 microbiopsie di tumori solidi e 20 campioni di leucemia linfoblastica acuta (LLA) di tipo T non consecutivi, diagnosticati e trattati presso il Servizio di Oncologia Pediatrica della Seconda Università di Napoli.
2. analisi dei livelli di espressione del gene della staminalità NGFR (nerve growth factor receptor)

studio in vitro

3. analisi di Immunoprecipitazione cromatinica (ChIP) utilizzando un anticorpo diretto contro EZH2 su linea cellulare Jurkat, e su linfloblasti isolati da pazienti pediatrici affetti da LLA, per valutare il suo controllo su INK4a.

CAPITOLO 7

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto su 28 microbiopsie di tumori solidi (10 rabdomiosarcomi (RMS), 7 sarcomi di Ewing, 6 tumori di Wilms e 5 tumori neuroectodermici primitivi (PNET)) e su 20 campioni di leucemia linfoblastica acuta (LLA) di tipo T.

I pazienti, non consecutivi, di età compresa tra 13 mesi e 14 anni (mediana 8 anni) sono stati diagnosticati e trattati presso il Servizio di Oncologia Pediatrica della Seconda Università di Napoli.

A partire da tali campioni criopreservati a -80°C, sono state eseguite le estrazioni del DNA, dell'RNA e delle proteine. Ciascuna microbiopsia è stata suddivisa in tre porzioni più piccole per poter effettuare separatamente le diverse estrazioni ed è stato utilizzato un omogeneizzatore per frantumare il campione.

I linfoblasti sono stati separati alla diagnosi, dal prelievo di aspirato midollare, mediante centrifugazione in gradiente di densità di Ficoll e conservati a -80°C con FBS inattivato al calore e DMSO al 10%. Per eseguire le estrazioni i linfoblasti, scongelati in ghiaccio, sono stati sottoposti ad un lavaggio con soluzione fisiologica mediante centrifugazione a 4°C a 1500 giri per 5 minuti.

L'estrazione delle proteine e dell'RNA è stata eseguita anche su un campione di aspirato midollare, tessuto muscolare, renale e osseo non patologici, usati come controlli.

7.1 Separazione dei linfoblasti

I linfoblasti leucemici vengono separati dall'aspirato midollare e dal sangue periferico mediante centrifugazione su gradiente di densità Ficoll- Hypaque (Sigma Aldrich) per 20 minuti a 1500 giri a temperatura ambiente. Tutti i campioni sono processati entro 5 ore dall'aspirato midollare e dal prelievo di sangue periferico. Dopo centrifugazione si formano diversi strati all'interno della provetta: in successione si hanno sul fondo i globuli rossi e polimorfonucleati, lo strato di Ficoll, l'anello contenente i linfoblasti e monociti ed infine il siero. L'anello di linfoblasti viene prelevato e viene aggiunta soluzione fisiologica per poter effettuare due lavaggi, centrifugando a 1500 giri per 5 minuti a 4 ° C. La separazione delle cellule è stata eseguita in condizioni di sterilità, sotto cappa a flusso laminare. I linfoblasti possono essere quindi utilizzati per l'estrazione proteica o per essere criopreservati a -80°C prima dell'analisi e processati entro 6 mesi. Per il congelamento i linfoblasti sono divisi in diverse vials ad una concentrazione di circa 3 milioni di cellule /mL, a cui viene aggiunto siero più DMSO al 10% per preservare l'integrità delle membrane durante lo scongelamento.

7.2 Estrazione del DNA

L' estrazione del DNA è stata eseguita utilizzando il kit Qiagen DNA Blood Mini Kit:

- per le sole microbiopsie è stata eseguita una fase iniziale con buffer ATL e proteinasi K posti a 56°C fino al raggiungimento della lisi, vortexando periodicamente
- Incubazione con proteinasi K e buffer di lisi AL a 58°C per 15 minuti (70°C per le microbiopsie).
- Aggiunta di 200 µL di etanolo.
- Centrifugazione a 6000 giri per un minuto.
- Applicazione della mistura ad una colonnina a scambio ionico
- Centrifugazione a 6000 giri per un minuto.
- Lavaggio con 500 µL di buffer AW1
- Centrifugazione a 6000 giri per 5 minuti
- Lavaggio con 500 µL di buffer AW2
- Centrifugazione a 20.000 giri per 5 minuti
- Eluizione con 100 µL di buffer AE preriscaldato a 65°C
- Centrifugazione a 6000 giri per 5 minuti

L' analisi quantitativa e qualitativa dei campioni estratti è stata valutata allo spettrofotometro (Nanodrop) ad una lunghezza d'onda di 260nm e con corsa elettroforetica in gel di agarosio all' 1% in tampone di corsa TBE 1X.

Il tampone di corsa 10X è stato preparato con 54 g di TRIS base, 38,5 g di acido borico e 20 mL di EDTA pH 8.0 per un volume finale di 500 mL.

7.3 Estrazione proteica

I campioni criopreservati appartenenti alla Banca Biologica del Servizio di Oncologia Pediatrica, sono stati scongelati in ghiaccio e centrifugati a 1200 giri per 5 minuti a 4° C. Dopo centrifugazione il surnatante è stato eliminato e i campioni sono lisati mediante incubazione per 15 minuti in ghiaccio con 500-1000 µL di Buffer di lisi; per un volume di 50 mL sono stati preparati:

- 2,5 mL di TRIS HCl 1 M
- 1,5 mL NaCl 5 M
- 10 µL NaF 0,5 M
- 500 µL NP40 100%
- 45,49 mL di H₂O

Al buffer di lisi sono stati aggiunti gli inibitori delle proteasi: 4µL/mL di PMSF, 2µL/mL di aprotinina e pepstatina, 1µL/mL di Sodio Ortovanadato. Le cellule lisate sono state centrifugate a 4° C a 12000 giri per due minuti e recuperato il surnatante che contiene le proteine totali. La concentrazione proteica è stata determinata allo spettrofotometro a 595 nm con il saggio colorimetrico Bio-Rad, che fa uso del colorante blue di Coomassie. Tale saggio si basa sul metodo Bradford che permette di quantizzare le proteine estratte attraverso il cambiamento di colore del blue di Coomassie in rapporto alla concentrazione proteica. La retta di taratura è stata ottenuta usando come standard di riferimento l'albumina di siero bovino (BSA), in quantità note : 0,2-0,4-0,7-1-2-3 µg.

7.4 Saggio WESTERN BLOTTING

Le proteine estratte sono state analizzate mediante Western Blotting. Il gel di acrilamide, preparato in base al peso molecolare della proteina da studiare, è costituito dal lower gel e l'upper gel.

5 mL di lower gel sono stati preparati con :

- H₂O
- acrilamide al 30%
- Tris 1,5 M (Ph 8.8)
- Sodio dodecil solfato (SDS 10%)
- Ammonio persolfato (APS)
- TEMED

Si versa all'interno della cameretta elettroforetica e sull'acrilamide si versa un sottile strato di acqua per favorire la polimerizzazione ed evitare il contatto con l'aria. Intanto sono stati preparati 3 mL di upper gel costituito da :

- H₂O
- acrilamide al 30%
- Tris 1,0 M (Ph 6.8)
- SDS 10%
- Ammonio persolfato
- TEMED

Una volta polimerizzato il lower gel, è stata eliminata l'acqua ed è stato versato l'upper gel nel supporto inserendo il pettine per la formazione dei pozzetti e si lascia polimerizzare.

Si prepara il marker con 10 µL di marker e 10 µL di Buffer Laemmli 1X

composto da TrisHCl (pH 6.8) 62.5 mM, Glicerolo 25%, SDS 2%, Blu di bromofenolo 0,01%, beta-mercaptoetanololo 5%. Il marker, Kaleidoscope Prestained Standard (Bio-Rad), consiste unicamente di sei proteine colorate con un range di peso molecolare che va da 200,00 a 7,135 Dalton. I colori sono stati attaccati covalentemente alle proteine standard in modo da non potersi dissociare durante l'uso. I campioni sono stati preparati utilizzando un volume di estratto proteico totale corrispondente ad una concentrazione di 15 microgrammi di proteine totali, è stato raggiunto un volume finale di 20 μ L con Laemmli 1X e i campioni sono stati bolliti per due minuti. Il gel una volta polimerizzato è stato inserito nella cameretta di corsa contenente 1 L di tampone di corsa costituito da Tris 10 X 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1%; preparato dalla soluzione madre (100 mL di soluzione madre + 900 mL di H₂O). I campioni sono stati caricati con il marker (5 μ L) che permetterà di individuare la proteina d'interesse. È stato fatto correre a 130 V nell'upper gel dove le proteine migrano insieme fino a quando non sono arrivate nel lower gel dove iniziano a separarsi passando ad un voltaggio di 170 V per un'ora e mezza. Poco prima della fine della corsa è stata preparata la membrana di PVDF in metanolo per 10 minuti. Terminata la corsa è stato effettuato il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana. In una vaschetta è stato inserito il tampone di trasferimento costituito da Tris 10 X 25 Mm, Glicina 192 mM, Metanolo 20%, preparato dalla soluzione madre (100 mL di soluzione madre, 200 mL di metanolo e 700 mL di H₂O), ed è stato preparato il sandwich posizionando sul supporto una spugnetta imbevuta di tampone di corsa, un cartoncino, il gel, la membrana PVDF, un altro cartoncino e infine un'altra spugnetta; il tutto chiuso all'interno del supporto e inserito nella camera di trasferimento. Il trasferimento viene effettuato a 100 V per un'ora e

mezza. La membrana è stata recuperata e messa in latte al 6% per una notte a 4° C. Una volta lasciata ambientare per circa un'ora sono stati effettuati due lavaggi veloci con una soluzione 2; per un volume di 500 mL si preparano 10,5 g di NaCl 0,36 M , 25 mL di TBS 20 X, 2,5 mL di Triton 0,5% e 2,5 mL di Tween 20 0,5%, e due lavaggi della durata di dieci minuti con la stessa soluzione in agitazione. Successivamente è stato effettuato un ulteriore lavaggio con una soluzione 1; per 500 mL si preparano 25 mL di TBS 20X e 2,5 mL di Tween 20 0,5% per 10 minuti in agitazione. La membrana è stata incubata separatamente per 1 ora in agitazione continua con 3 Anticorpi (Ab) 1°: Ab monoclonale anti EZH2 (80kDa), Ab monoclonale anti SUZ12 (95kDa) ed Ab policlonale anti EED (50/53 kDa) (Santa Cruz Biotechnology) diluiti 1:500 in TBS Tween. Sono stati poi eseguiti altri 3 lavaggi della durata di dieci minuti in agitazione e le membrane sono state incubate con Ab 2° diluito 1: 5000, con latte al 3%. Sono stati eseguiti di nuovo i lavaggi e le proteine sono state rivelate utilizzando un substrato chemiluminescente (ECL; Amersham Life Scienze, Buckinghamshire, UK) secondo protocollo consigliato dal produttore. La chemiluminescenza è stata visualizzata con ChemiDoc XRS Sistem.

7.5 Estrazione dell'RNA

L'estrazione dell'RNA è stata condotta utilizzando il Tri-Reagent (Sigma-tau) che combina il fenolo con la guanidina isotiocianato in una soluzione monofase che lisa le cellule, denatura le proteine mantenendo integro l'RNA attraverso l'inibizione delle RNAsi. L'estrazione eseguita consiste in una fase di separazione, di precipitazione, di lavaggio e solubilizzazione.

- Fase di separazione

Le cellule in Tri-Reagent sono state incubate per 5 minuti a temperatura ambiente per permettere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici e successivamente addizionate con 0,2 mL di cloroformio (Carlo Erba) per 1 mL di Trizol, agitati vigorosamente per 15 secondi, incubati a temperatura ambiente per 10 minuti e centrifugati a 12,000 g per 15 minuti a 4 °C . Dopo la centrifugazione è stata osservata la separazione delle diverse fasi: una fase organica inferiore e una interfase contenenti DNA e proteine, ed una fase superiore acquosa incolore contenente l' RNA.

- Fase di precipitazione

La fase acquosa di ogni campione è stata prelevata e ad essa sono stati aggiunti 0,5 mL di alcool isopropilico (Carlo Erba) per 1 mL di Tri-Reagent usato nella fase iniziale, incubata per 10 minuti a temperatura ambiente per favorire la precipitazione e successivamente centrifugata a 12,000 g per 8 minuti a 4 °C.

L'RNA precipitato si presenta sottoforma di gel o di pellet bianco sul fondo della provetta.

- **Fase di lavaggio**

Il surnatante è stato allontanato ed il pellet è stato lavato con 1 mL di etanolo al 75% (Carlo Erba) per mL di Tri-reagent e centrifugato a 7500 g per 5 minuti a 4 °C.

- **Fase di solubilizzazione**

Allontanato il surnatante, l'RNA è stato asciugato sotto cappa sterile in modo da far evaporare eventuali residui di alcool e risospeso in 20 µL di acqua DEPC (Dietilpirocarbonato) RNase free, agitati mediante vortex ed incubati per 10 – 15 minuti a 55 – 60 °C ed infine sottoposto a trattamento con DNase I. La concentrazione e la purezza dei campioni sono state determinate spettrofotometricamente (NanoDrop ND 1000, NanoDrop Technologies, LLC, Wilmington, US)

7.6 Isolamento dell'RNA da tessuto in Paraffina

I tessuti non patologici utilizzati come controllo (muscolare, osseo e renale) erano inclusi in paraffina e per effettuare l'estrazione dell'RNA è stato utilizzato un kit specifico (Pure Link FFPE total RNA isolation kit Invitrogen).

Per ogni estrazione sono state utilizzate 8 sezioni con uno spessore di 10 µm e ogni singolo passaggio in centrifuga è stato effettuato rigorosamente a TA.

• Desparaffinizzazione e lisi

Le sezioni poste in un tubo da microcentrifuga con 300 µL di Melting Buffer, sono state incubate per 10 minuti a 72°C effettuando un passaggio sul vortex

ogni 2-3 minuti. Sono stati aggiunti 20 μL di Proteinasi K e posti a 60°C per 1 ora. Se al termine di questa incubazione fossero stati visibili ancora dei detriti nella provetta, il tempo era aumentato fino ad un massimo di tre ore. Successivamente il campione è stato centrifugato per 5 minuti alla massima velocità per ottenere la separazione del tessuto lisato dalla paraffina che forma uno strato sottile in superficie. Penetrando lo strato di paraffina con un puntale, il tessuto è stato trasferito in una provetta sterile.

- Isolamento dell'RNA

Prima di iniziare un'aliquota di acqua RNase-free è stata preriscaldata a 65°C . Al campione ottenuto dalla fase precedente, sono stati aggiunti 400 μL di Binding Buffer, contenente guanidina isotiocianato, e 800 μL di etanolo 100%.

Il campione è stato trasferito in una apposita colonnina fornita dal kit ed è stato effettuato un passaggio in centrifuga per 1 minuto a 800 giri.

Successivamente sono stati effettuati tre lavaggi della colonnina utilizzando ogni volta 500 μL di Wash Buffer ed centrifugando per 1 minuto alla massima velocità.

Utilizzando acqua RNase-free preriscaldata, l'RNA è stato eluito centrifugando per un minuto alla massima velocità. A questo punto la concentrazione dell'RNA è stata calcolata allo spettrofotometro (Nanodrop) a 260 nm

7.7 Reazione di Dnasi I sull'RNA

Allo scopo di eliminare tracce di DNA contaminanti la preparazione i campioni sono stati sottoposti a digestione con DNAsi I. La reazione è stata condotta aggiungendo 2 µl di tampone per DNAsi 10X (400 mM Tris Hcl pH 8, 100mM MgSO₄, 10mM CaCl₂), 5U di DNAsi RNAsi free e incubata per 10 minuti a 65°C in presenza di una soluzione di stop (20mM EGTA pH 8) (Promega, Madison, USA).

7.8 Retrotrascrizione

L'RNA totale è stato retrotrascritto in cDNA utilizzando una miscela di esameri le cui sequenze sono casuali, così da permettere l'appaiamento su tutti i messaggeri. Tutte le procedure sono state eseguite in ambiente ad uso esclusivo per RNA al fine di evitare contaminazioni.

Il protocollo di retro trascrizione, High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems), prevede che venga preparata una mix per ciascun campione da retrotrascrivere così composta:

- o 10x RT Buffer 2 µL
- o 10x RT Random Primers 2 µL
- o 25x dNTPs Mix (100mM) 0,8 µL
- o MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/µl) 1 µL
- o RNase Inhibitor (20U/µL) 1 µL
- o acqua libera da nucleasi

La retrotrascrizione, avvenuta in un volume totale di 20 µL e utilizzando 1 µg di RNA, ha previsto i seguenti passaggi: stadio 1: 25°C per 10 minuti

(attivazione dell'enzima); stadio 2: 37°C per 120 minuti (reazione di retro trascrizione); stadio 3: 85°C per 15 minuti (inattivazione della trascrittasi inversa). Il cDNA ottenuto è stato poi criopreservato a -20°C.

7.9 Real Time PCR

I campioni di cDNA eleggibili (7 LLA e 17 tumori solidi) sono stati analizzati mediante Real time PCR utilizzando il SYBR Green come indicatore di fluorescenza e verificando la specificità dei prodotti amplificati mediante curva di melting. La Real-Time PCR è una tecnica che consente la simultanea amplificazione e quantificazione del DNA stampo attraverso il monitoraggio in tempo reale dell'intensità di fluorescenza che si libera dal prodotto di amplificazione durante la reazione a catena della DNA polimerasi: questo risulta possibile mediante l'impiego di marcatori fluorescenti il cui accumulo, a livello del prodotto di reazione, segue la stessa cinetica della PCR.

L'analisi dell'espressione genica è stata condotta sui campioni conservati a -80°C per i seguenti geni: EZH2, SUZ12, EED e NGFR. I primers sono stati disegnati mediante impiego del software Universal Probe Library Assay Design Center Applied Biosystem, a cavallo tra 2 esoni adiacenti, in modo tale da escludere l'amplificazione di eventuale DNA contaminante (Tabella VII).

TAB.VII Primer utilizzati per l'analisi dell'espressione genica

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
EZH2	CGCTTTTCTGTAGGCGATGT	TGGGTGTTGCATGAAAAGAA
SUZ12	GGGAGACTATTCTTGATGGGAG	ACTGCAACGTAGGTCCCTGA
EED	GAAATTCCATCCAAGATCCA	TGGATATTCCATAATCGTAAACA
NGFR	ACGGAGGCCTCTACAGCA	GCAGAGCCGTTGAGAAGC
β- actina	GCGAGAAGATGACCCAGATC	GGATAGCACAGCCTGGATAG

La mix di reazione per ciascun campione stata preparata con:

- o 2 µL di cDNA campione
- o 0,75 µM del primer Forward e 0,75 µM del Reverse
- o Acqua priva di nucleasi
- o Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) contenente KCl (100mM), Tris-HCl (40mM), pH 8.4, una miscela di dNTP (0.4mM) MgCl₂ (6 mM), una DNA polimerasi iTaq (50 U/mL) e il fluoroforo SYBR Green.

Il fluoroforo SYBR Green, intercalandosi nella doppia elica del DNA che di volta in volta viene amplificato, emette una fluorescenza 1000 volte superiore a quella emessa in assenza di DNA. Questa caratteristica lo rende ideale per gli studi di quantificazione degli acidi nucleici, in quanto, la fluorescenza emessa dal campione che si amplifica è direttamente correlata alla quantità di acido nucleico disponibile inizialmente. Il SYBR Green, tuttavia, si lega in modo indiscriminato ad ogni doppio filamento di cDNA ma la specificità della reazione è determinata dall'analisi della curva di melting (T_m)

dell'amplicone ottenuto. L'utilizzo di questo fluoroforo consente di poter effettuare una quantificazione relativa, pertanto l'espressione di un dato trascritto in due tessuti deve essere confrontata con l'espressione di un gene costitutivo in quanto questa operazione normalizza le differenze di espressione che possono derivare da una variabilità sperimentale. L'amplificazione è stata condotta utilizzando lo strumento ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System con il seguente programma: 10 minuti a 95°C, 15 secondi a 95°C, 1 minuto a 60°C. Tali cicli sono stati ripetuti in media 40 volte. Come controllo è stato utilizzato il gene costitutivo β -ACTINA. La reazione, inoltre, è stata condotta su 3 diluizioni scalari dei cDNA di ogni campione ciascuna delle quali in duplicato. Al termine dell'amplificazione, lo strumento determina la temperatura di fusione di ciascun prodotto amplificato e la rende visibile in un grafico, in cui è riportata l'intensità di fluorescenza in funzione della temperatura. E' possibile, in questo modo, mettere in evidenza la presenza di amplificazioni spurie, che presenteranno una "melting curve" differente da quella del prodotto specifico. La quantificazione è relativa e viene fatta calcolando il ΔC_T cioè la differenza tra il C_T relativo del gene di interesse e il C_T relativo al gene costitutivo, nel nostro caso β -ACTINA. Dalla differenza tra i due valori si calcola il $\Delta\Delta C_T$. Per conoscere l'espressione del trascritto nei soggetti affetti da tumore, rispetto all'mRNA del gene nei soggetti non affetti, si calcola $2^{-\Delta\Delta C_T}$ che per il gruppo dei campioni controllo sarà uguale ad 1, e rappresenta il numero di volte (in più o in meno) in cui il gene di interesse è espresso rispetto all'espressione basale (quella riscontrata nei campioni normali). Con tale metodo per ogni campione la quantità del gene di interesse analizzato è quindi espressa come n-volte rispetto alla quantità presente nei campioni controllo.

7.10 Coltura cellulare

La linea cellulare Jurkat (DSMZ), leucemia linfoblastica di tipo T derivante da un ragazzo di 14 anni, è stata utilizzata come modello di analisi per i campioni di LLA. Le cellule, criopreservate a -80°C , sono state scongelate aggiungendo terreno minimo (RPMI con rosso fenolo) e raggiunto un volume di 10 ml sono state sottoposte a centrifugazione a 4°C a 12000 giri per 5 minuti. Dopo aver eliminato il surnatante, il pellet è stato risospeso aggiungendo terreno minimo (RPMI con rosso fenolo) fino ad un volume di 1 mL.

A questo punto sono stati effettuati i saggi di vitalità:

1. Conta cellulare: 50 μL di campione + 150 μL di soluzione fisiologica (diluizione 1:4). Lettura al conta globuli (Sysmek k-4500).
2. Saggio di esclusione Trypan Blue: 50 μL di campione + 200 μL di soluzione fisiologica + 250 μL di colorante Trypan blue (diluizione 1:1). La percentuale di cellule vive è stata analizzata al microscopio ottico utilizzando la camera di Burker.
3. Saggio MTT (2,5 difeniltetrazolinbromide): 50 μL di campione + 50 μL di mezzo di coltura + 10 μL di MTT (diluizione 10:1); si lascia incubare a 37°C per 3 ore, si blocca la reazione con isopropanolo acido e si legge allo spettrofotometro (NanoDropspectrophotometer ND1000) ad una lunghezza d'onda 570 nm.

Le cellule sono state piastrate e in ogni pozzetto sono stati posti 1 mL di terreno completo (RPMI con rosso fenolo + siero 10% + PENSTREP 1%) e $1 \cdot 10^6$ cellule/ml e poste in incubatore di CO_2 .

Su tali cellule è stata eseguita l'estrazione dell'RNA, del DNA e delle proteine ed è stata effettuata la immunoprecipitazione cromatinica.

7.11 Immunoprecipitazione Cromatinica (ChIP)

La immunoprecipitazione cromatinica (ChIP) è una tecnica che permette di studiare l' interazione di specifiche proteine con il DNA utilizzando anticorpi monoclonali. È una metodica che prevede varie fasi e in questo studio è stata effettuata su cellule Jurkat e su blasti leucemici isolati da due pazienti pediatrici affetti da LLA di tipo T, posti in coltura, che avevano raggiunto un numero di circa $15 \cdot 10^6$ di cellule, utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro EZH2.

Il kit (ChIP-IT Express Enzymatic- Active Motif) prevede l' utilizzo di enzimi per il taglio della cromatina che non riconoscono una specifica sequenza ma prediligono le zone più esposte come quelle tra due nucleosomi. L' aspetto più critico è la distruzione della membrana plasmatica senza intaccare quella nucleare e per tale procedura è stato usato un dounce homogenizer per ottenere la rottura meccanica della membrana cellulare.

Alle cellule recuperate è stata aggiunta una soluzione per il fissaggio (0,54 mL di formaldeide al 37% in 20 mL di RPMI con rosso fenolo) e sono state poste su agitatore basculante per 10 minuti a Temperatura ambiente (TA). Il fissaggio è stato interrotto con una soluzione Glycine STOP-FIX solution (1 mL di glicina 10X, 1 mL PBS 10X , 8 mL di acqua distillata) che ha agito per 5 minuti a TA .

Successivamente è stato utilizzato un Lysis buffer contenente inibitori delle proteasi e le cellule sono state incubate per 30 minuti in ghiaccio. A questo punto utilizzando il dounce homogenizer ghiacciato, le cellule sono state sottoposte al movimento meccanico per rompere la membrana plasmatica e successivamente tramite centrifugazione a 4°C per 10 minuti a 5000 giri.

Recuperato il pellet, contenente i nuclei, è stato incubati per 5 minuti a 37°C con 350 µL di Digestion Buffer, contenete inibitori delle proteasi. Al termine dell'incubazione ai nuclei preriscaldati è stato aggiunto il cocktail per il taglio enzimatico (0,5 µL di Stock Enzymatic Shearing Cocktail e 49 µL di glicerolo al 50%) e posto a 37°C per 10 minuti; tale tempo si è rivelato ottimale per ottenere un taglio della cromatina con un range tra 200 e 1500 bp, ma è stata effettuata l' incubazione anche a 5 e 15 minuti poiché i tempi di azione possono variare a seconda del tipo cellulare. La reazione di digestione enzimatica è stata bloccata con 7 µL di EDTA 0,5M freddo e posto in ghiaccio per 10 minuti. Il campione è stato centrifugato a 12000 giri per 10 minuti a 4°C ed è stato recuperato il supernatante (circa 400 µL) contenente la cromatina.

Prima di procedere con la immunoprecipitazione, è stato necessario verificare che la cromatina fosse stata tagliata correttamente per tale motivo 50 µL sono stati processati per verificare il taglio enzimatico e la concentrazione del DNA.

Verifica del taglio enzimatico e della concentrazione del DNA

Ai 50 µL sono stati aggiunti 150 µL di acqua distillata, 10 µL di NaCl 5M e sono stati incubati a 65°C per tutta la notte per invertire il cross-linking. In seguito è stato aggiunto 1µL di RNase A e posto a 37°C per 15 minuti; poi sono stati aggiunti 10 µL di Proteinasi K e incubato a 42°C per un'ora e mezzo.

È stata eseguita l'estrazione del DNA utilizzando 200 µL di una soluzione di fenolo/cloroformio 1:1 a pH 8 e dopo l' utilizzo del vortex, il campione è stato centrifugato alla massima velocità per 5 minuti. Trasferita la fase acquosa, ad

essa sono stati aggiunti 20 μL di acetato di sodio 3M a pH 5.2 e 500 μL di etanolo 100% ed incubata a -80°C per almeno 1 ora. Successivamente il campione è stato centrifugato per 10 minuti a 4°C alla massima velocità e dopo aver eliminato il supernatante sono stati aggiunti 500 μL di etanolo al 70% freddo e centrifugato per 5 minuti a 4°C alla massima velocità. Dopodiché è stato allontanato il supernatante e il pellet, lasciato asciugare, è stato risospeso in 30 μL di acqua distillata ed è stata misurata la concentrazione del DNA allo spettrofotometro (NanoDrop) a 260 nm ed è stato visualizzato su di agarosio al 1%.

Immunoprecipitazione

I rimanenti 350 μL potranno essere processati, ma prima 10 μL (Input DNA) sono stati trasferiti e posti a -20°C poiché verranno utilizzati successivamente come controllo per l'analisi PCR.

In base alla concentrazione della cromatina precedentemente calcolata, è stata preparata una soluzione contenente: Protein G Magnetic Beads, ChIP Buffer 1, la cromatina tagliata (7-25 μg), un Cocktail di inibitori delle proteasi fornito dal kit, l'anticorpo specifico per EZH2 (Active Motif) e se necessario acqua distillata per raggiungere un volume finale di 100 μL ed il campione è stato posto in agitazione a 4°C per tutta la notte. Dopo l'incubazione, utilizzando una barra magnetica, le biglie magnetiche sono trattenute sul fondo della provetta, ed è stato allontanato il supernatante; sono stati effettuati i lavaggi della biglie magnetiche utilizzando due buffer forniti dal kit (ChIP buffer 1 e 2).

A questo punto la cromatina è stata eluita con 50 μL di Elution Buffer AM2 ed è stata ottenuta reversione del Cross-linking con 50 μL di Reverse Cross-

linking Buffer; utilizzando nuovamente la barra magnetica le biglie sono trattenute e il supernatante, contenente la cromatina, è stato trasferito in una nuova provetta.

All'Input DNA, precedentemente messo da parte, è stato aggiunto il ChIP Buffer 2 e NaCl 5M così da ottenere un volume pari a quello della cromatina immunoprecipitata.

Entrambi i campioni sono stati posti per 15 minuti a 95°C e successivamente sono stati aggiunti 2 µL Proteinasi K e incubati a 37°C per 1 ora.

Al termine dell'incubazione sono stati addizionati 2 µL di Proteinasi K Stop Solution e i campioni sono stati conservati a -20°C pronti per essere ulteriormente processati.

La cromatina immunoprecipitata e il campione Input sono stati amplificati con una coppia di primer che identificano una regione (402 bp) del promotore del gene INK4a per verificare se EZH2 si legasse a questa regione. Come controllo positivo gli stessi campioni sono stati amplificati utilizzando una coppia di primer che identificano una regione del gene G γ dei geni globinici di tipo beta.

Il DNA è stato trasferito in una miscela di reazione di amplificazione contenente la soluzione dei 4 dNTPs, MgCl₂, buffer, oligonucleotidi specifici e la Taq Dna polimerasi la AmpliTaq Gold della Applied Biosystems secondo il seguente protocollo operativo:

DNA	1 µL
Forward primer (5mM)	0.5 µL
Reverse primer (5mM)	0.5 µL
dNTP (10mM)	1 µL
buffer 10X	2.5 µL

MgCl₂ (25 Mm) 1.5 µL

Taq polimerasi 5u/ µL 0.2 µL

Il tutto è stato portato a volume con H₂O bidistillata sterile per un volume finale di 25 µL. È stato utilizzato il seguente protocollo termico per INK4a: 95°C per 5', 35 cicli con tre temperature 95°C 30'', 60°C 30'', 72°C 30'', successivamente 72°C per 4' ed infine a 4°C per 5'; mentre per Gγ : 94°C per 5', 30 cicli con tre temperature 95°C 1', 57°C 1', 72°C 1', infine 72°C per 5' e 4°C 5'.

Di seguito sono riportati gli oligonucleotidi utilizzati per le reazioni di amplificazione disegnati attraverso il programma informatico Primer3 Input (version 0.4.0)

INK4a F: 5'-TGGTCTTTGGATCACTGTGC-3'

INK4a R: 5'-CACCGAGAAATCGAAATCACC-3'

Gγ R: 5'-AACTGTTGCTTTATAGGATTTT-3'

Gγ F: 5'-AGGAGCTTATTGATAACTCAGAC-3'

CAPITOLO 8

RISULTATI

8.1 TUMORI SOLIDI

➤ **Analisi quantitativa dei livelli di espressione di EZH2 nei campioni di tumore solido**

In tutti i campioni analizzati mediante Real Time PCR è stata osservata l'espressione di EZH2 e quasi tutti i campioni presentavano un notevole aumento di espressione rispetto al tessuto di controllo (Figura 1)

In particolare i campioni di Rabbdomiosarcoma analizzati mostravano da 0,50 a 2,8 volte un' espressione più alta rispetto al tessuto muscolare di controllo ad eccezione di un solo campione che presentava lo stesso livello di espressione del non patologico (Fig.1a).

I Sarcoma di Ewing studiati evidenziavano un'espressione da 0,50 a 4 volte maggiore paragonata al tessuto osseo non patologico ad eccezione di un solo campione che mostrava un livello di espressione uguale al controllo (Fig.1b).

I tumori di Wilms analizzati presentavano un livello di espressione da 0,2 a 4 volte superiore al tessuto renale non tumorale (Fig.1c).

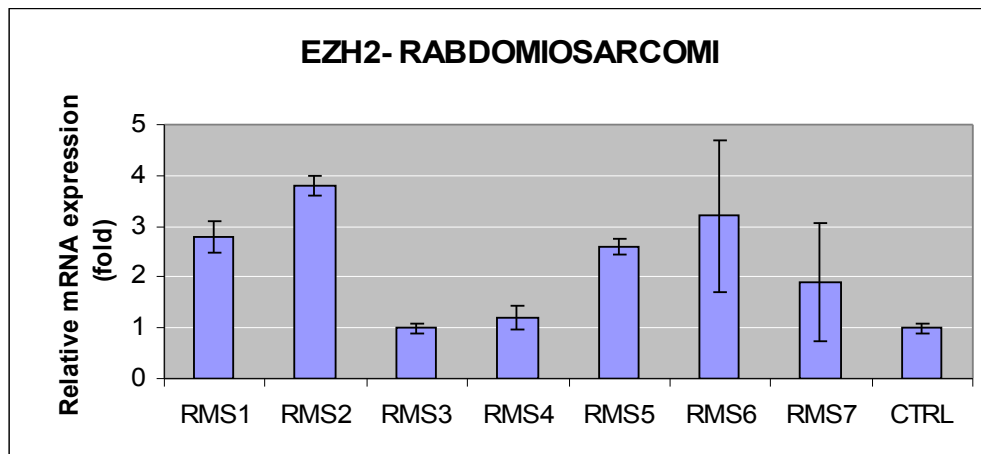


Fig.1a: analisi dei livelli di espressione di EZH2 nei campioni di Randomiosarcoma

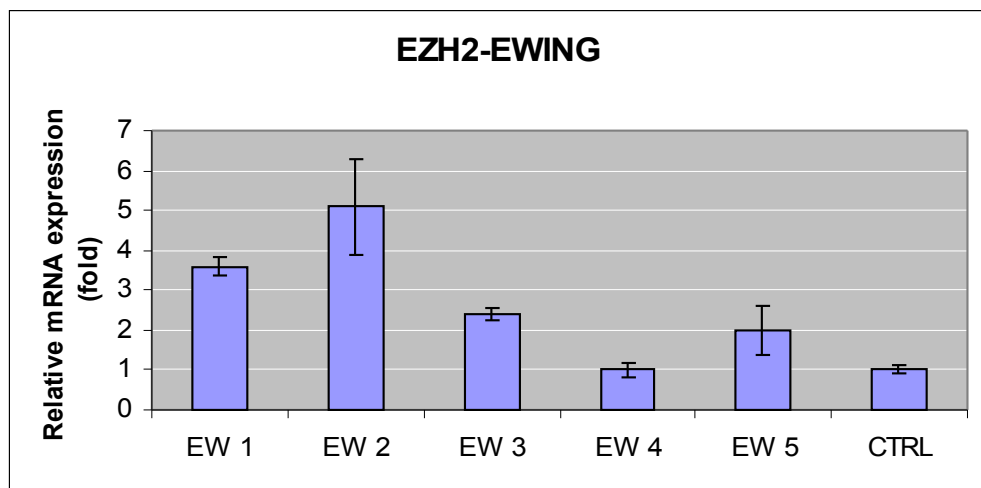


Fig.1b: analisi dei livelli di espressione di EZH2 nei campioni di sarcoma di Ewing.

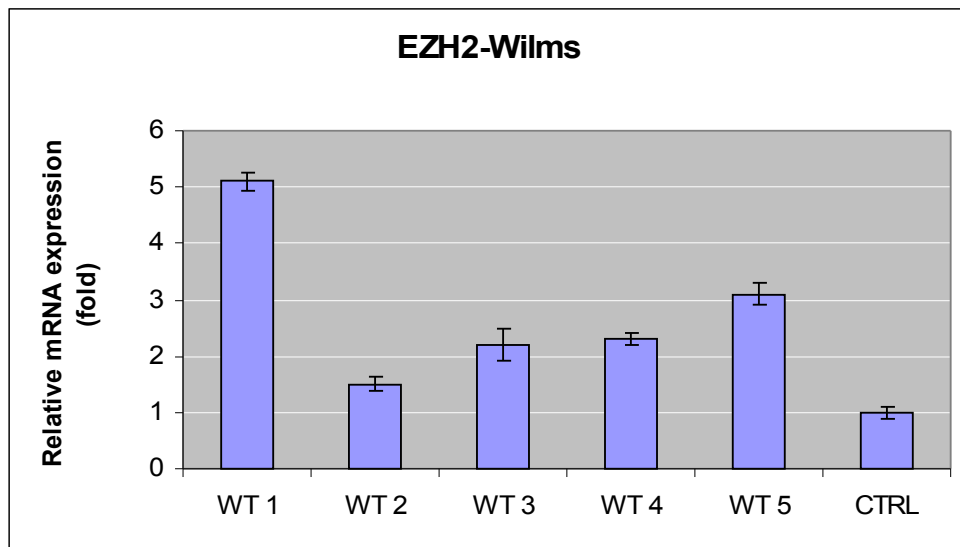


Fig.1c: analisi dei livelli di espressione di EZH2 nei campioni di tumore di Wilms.

➤ **8.2 Analisi quantitativa dei livelli di espressione di SUZ12 nei campioni di tumore solido**

Il fattore SUZ12 nei campioni di tumore solido studiati non ha mostrato grandi differenze a livello di trascritto quando paragonati al tessuto controllo (Figura 2).

In particolare tra i campioni di Rabdomiosarcoma solo un campione mostrava 0,5 volte una maggiore espressione rispetto al tessuto muscolare non patologico (Fig.2a).

Anche per i Sarcomi di Ewing soltanto un campione mostrava un livello di espressione maggiore del tessuto osseo di controllo (Fig.2b) mentre per i tumori di Wilms tutti presentavano un uguale livello di espressione paragonato al tessuto renale non patologico (Fig2c).

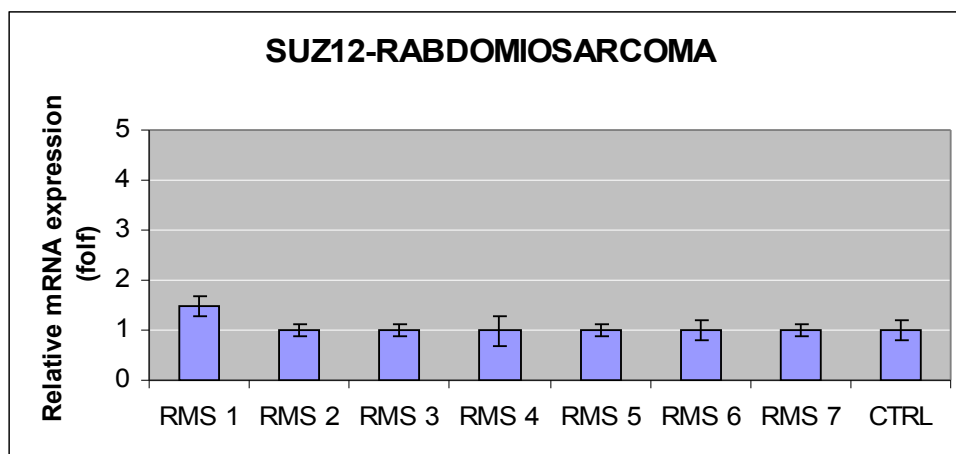


Fig. 2a: analisi dei livelli di espressione di SUZ12 nei campioni di Rabdomiosarcoma.

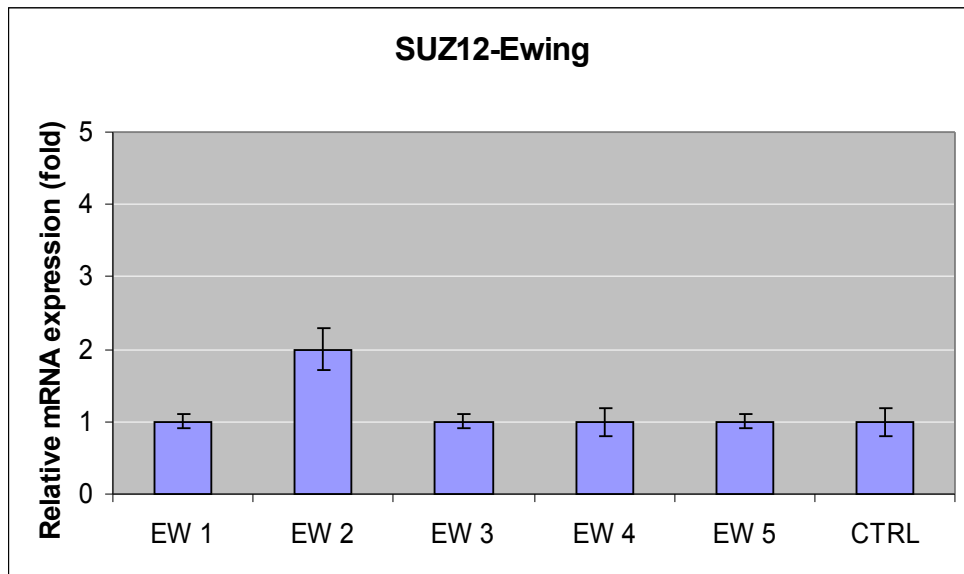


Fig.2b: analisi dei livelli espressione di SUZ12 nei campioni di sarcoma di Ewing.

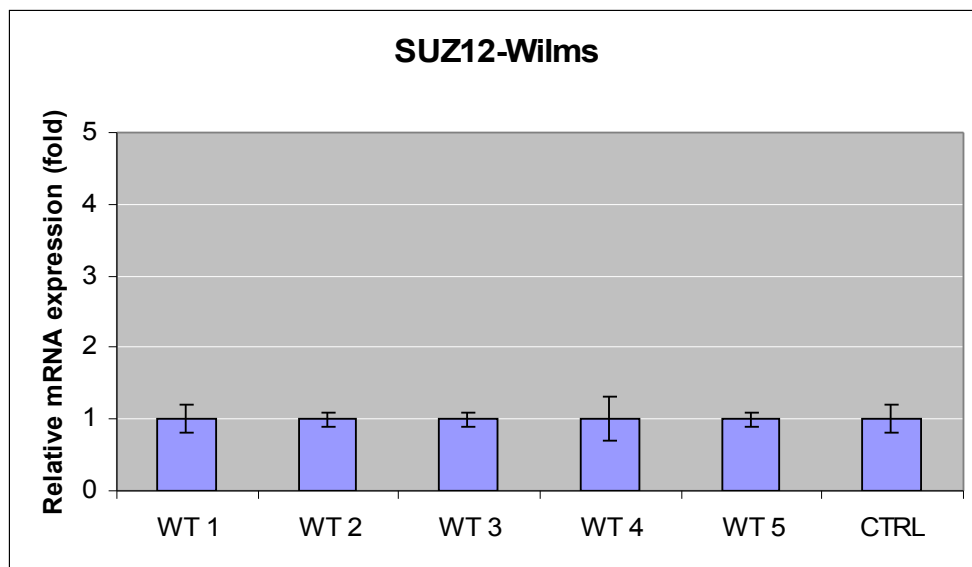


Fig.2c: analisi dei livelli di espressione di SUZ12 nei campioni di tumore di Wilms.

➤ **8.3 Analisi quantitativa dei livelli di espressione di EED nei campioni di tumore solido**

L'analisi mediante Real Time PCR per studiare i livelli di espressione di EED ha evidenziato che tutti i campioni, Rabbdomiosarcomi, Sarcomi di Ewing e tumori di Wilms, mostravano espressione basale ma nessuno presentava un livello superiore rispetto ai tessuti controllo utilizzati, rispettivamente tessuto muscolare, osseo e renale (Figura 3).

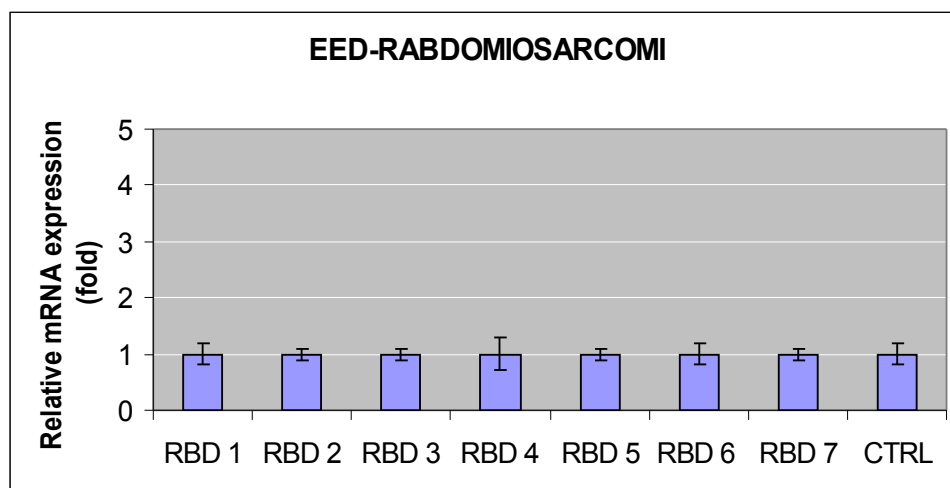


Fig.3a: analisi dei livelli di espressione di EED nei campioni di Rabbdomiosarcoma.

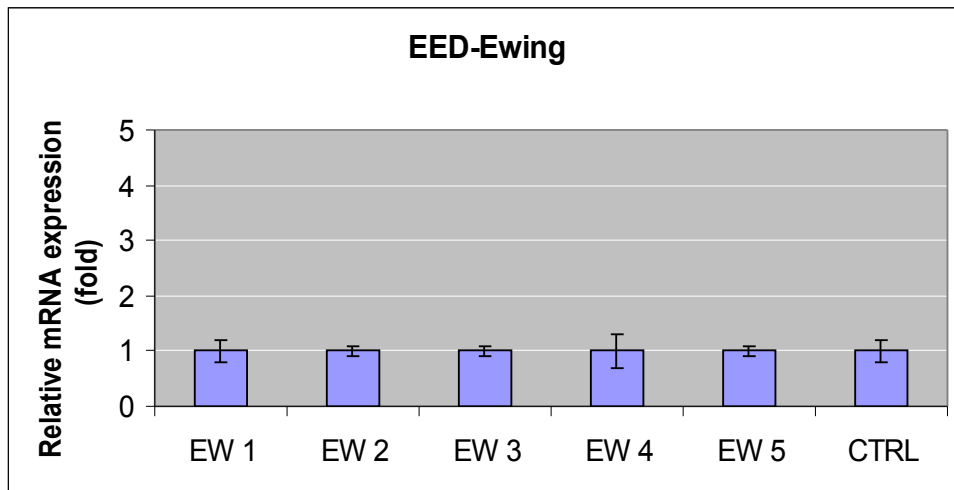


Fig. 3b: analisi dei livelli di espressione di EED nei campioni di sarcoma di Ewing.

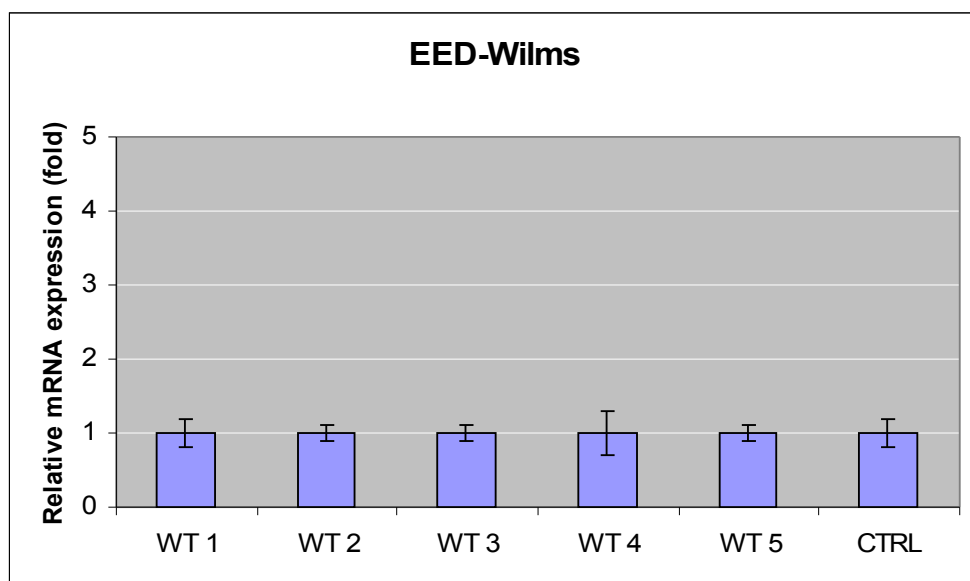


Fig.3c: analisi dei livelli di espressione di EED nei campioni di tumore di Wilms.

➤ **8.4 Analisi quantitativa dei livelli di espressione di NGFR nei campioni di tumore solido**

Mediante Real Time PCR è stata eseguita l'analisi dei livelli di espressione del gene NGFR (nerve growth factor receptor), coinvolto nelle caratteristiche di staminalità. L'analisi ha evidenziato valori di espressione molto alti nei campioni di tumore analizzati paragonati ai tessuti controllo (Figura4).

In particolare nei Rabbdomiosarcomi sono stati evidenziati dei livelli di espressione da 6,5 a 13 volte superiore al tessuto muscolare normale (Fig.4a).

Nei campioni di Sarcoma di Ewing sono stati osservati dei livelli di espressione da 6 a 12 volte maggiore del tessuto osseo non patologico (Fig.4b).

I tumori di Wilms presentavano un'espressione da 6 a 15 volte più alta del tessuto renale non tumorale (Fig.4c).

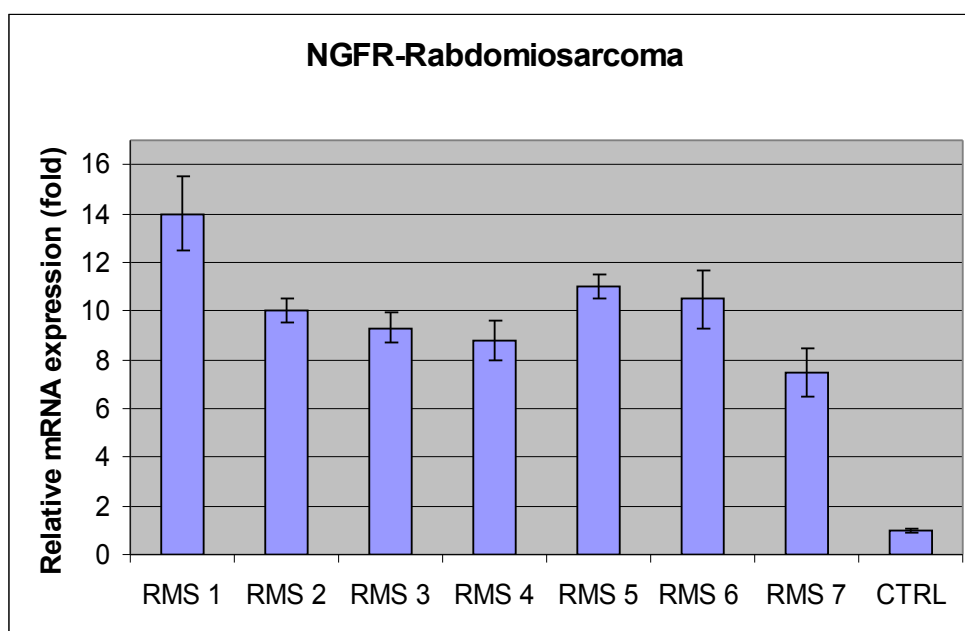


Fig.4a: analisi dei livelli di espressione di NGFR nei campioni di Rabbdomiosarcoma.

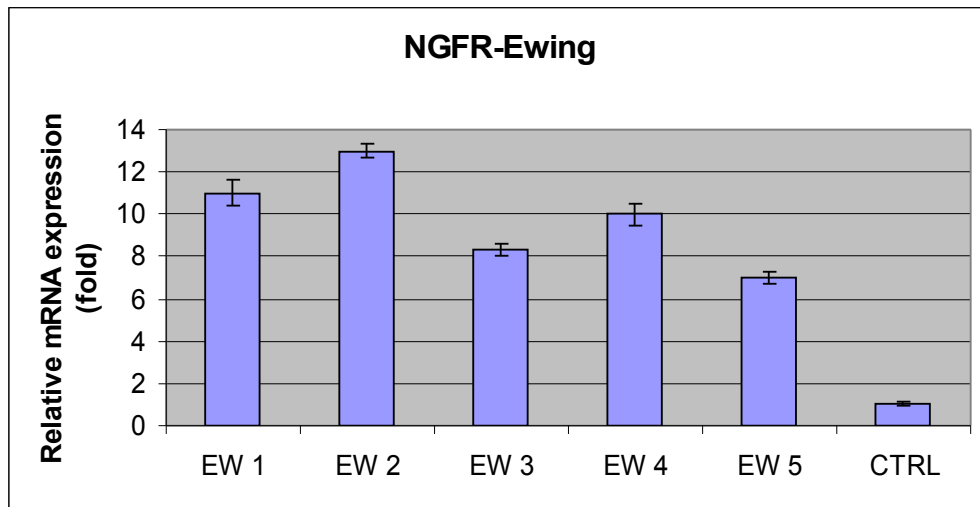


Fig.4b: analisi dei livelli di espressione di NGFR nei campioni di sarcoma di Ewing.

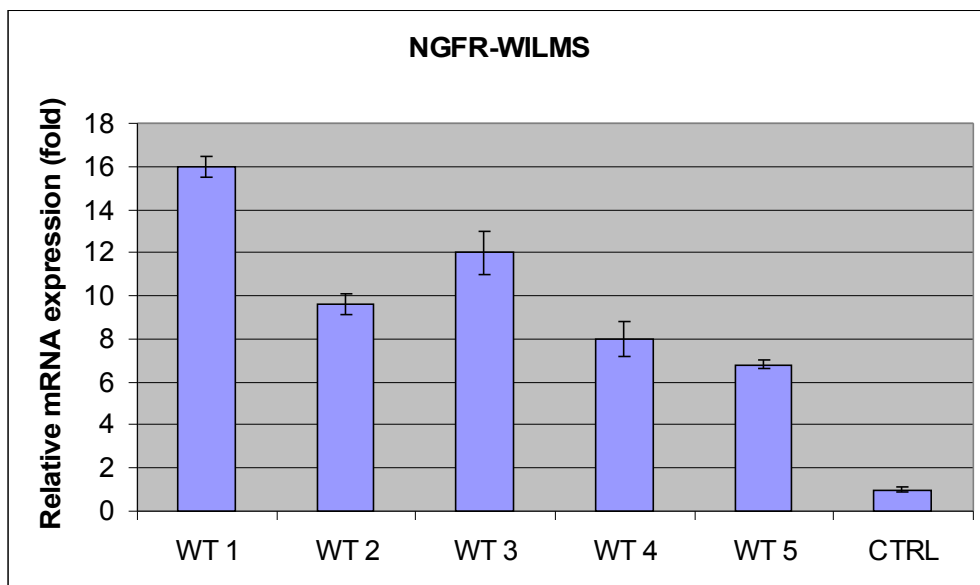


Fig.4c: analisi dei livelli di espressione di NGFR nei campioni di tumore di Wilms.

➤ **8.5 Analisi qualitativa dell'espressione di EZH2, SUZ12 e EED nei campioni di tumore solido pediatrico**

Per i campioni di tumore solido l'espressione a livello proteico di EZH2 è stata osservata in 19/28 (67,8%) campioni, SUZ12 in 9/28 (25%) e per EED in 23/28 (82%).

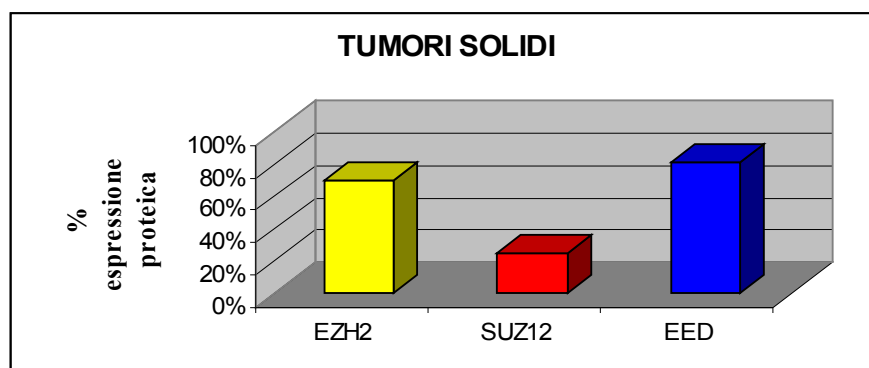
In particolare dei 19 tumori solidi che esprimono EZH2: 7 (37%) sono Rabbdomiosarcomi, 5 (27%) sarcomi di Ewing, 4 (21%) tumori di Wilms e 3 (15%) PNET; dei 9 campioni che esprimono la proteina SUZ12: 3 (34%) sono Rabbdomiosarcomi, 1 (11%) sarcomi di Ewing, 3 (34%) tumori di Wilms e 2 (21%) PNET; infine dei 23 campioni che esprimono EED: 10 (43%) Rabbdomiosarcomi, 5 (23%) sarcomi di Ewing, 4 (17%) tumori di Wilms e 4 (17%) PNET (Tabella VIII – Figura 5 e 6).

Tab.VIII: Quadro dell'espressione delle proteine del complesso PRC2

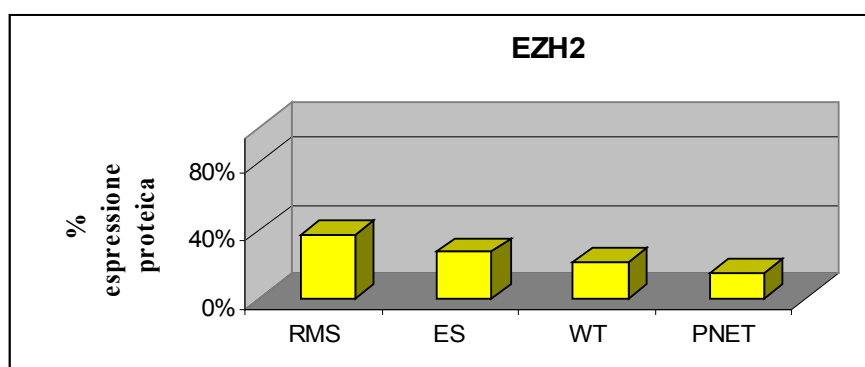
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	E1	E2	E3	E4
EZH2	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
SUZ12	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
EED	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

	E5	E6	E7	W1	W2	W3	W4	W5	W6	P1	P2	P3	P4	P5
EZH2	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
SUZ12	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
EED	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+

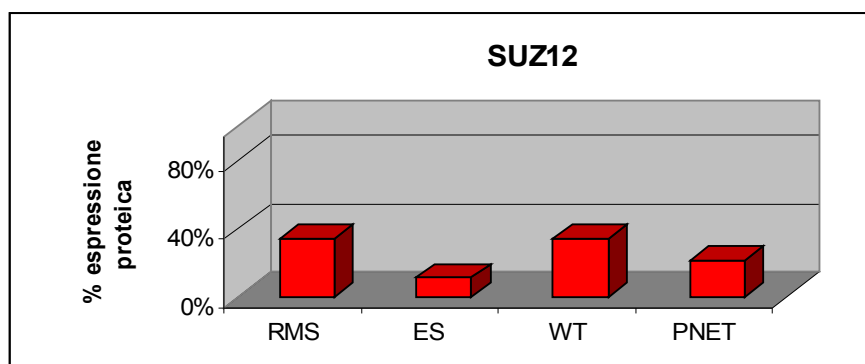
R: Rabbdomiosarcoma; **E:** Sarcoma di Ewing; **W:** Tumore di Wilms; **P:** PNET



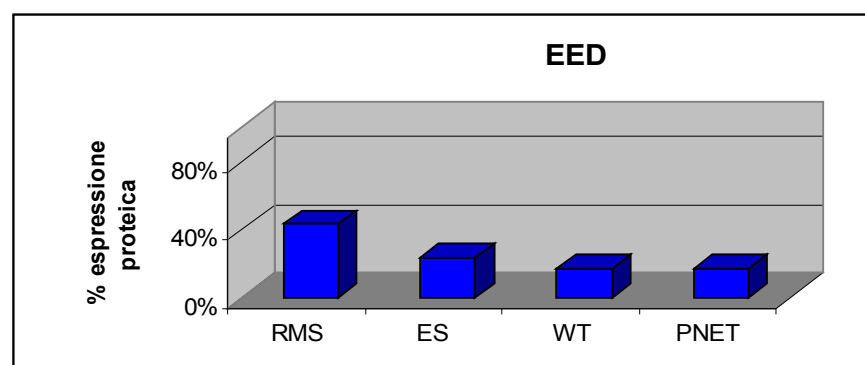
A



B



C



D

Fig. 5 : **A** = percentuale di espressione delle proteine del complesso PRC2 nei tumori solidi analizzati; **B** = percentuale di espressione della proteina EZH2 nei tumori solidi; **C** = percentuale di espressione della proteina SUZ12 nei tumori solidi; **D** = percentuale di espressione della proteina EED nei tumori solidi. **RMS:** Rabbdomiosarcoma; **ES:** sarcoma di Ewing; **WT:** tumore di Wilms; **PNET:** tumore neuro-ectodermico primitivo.

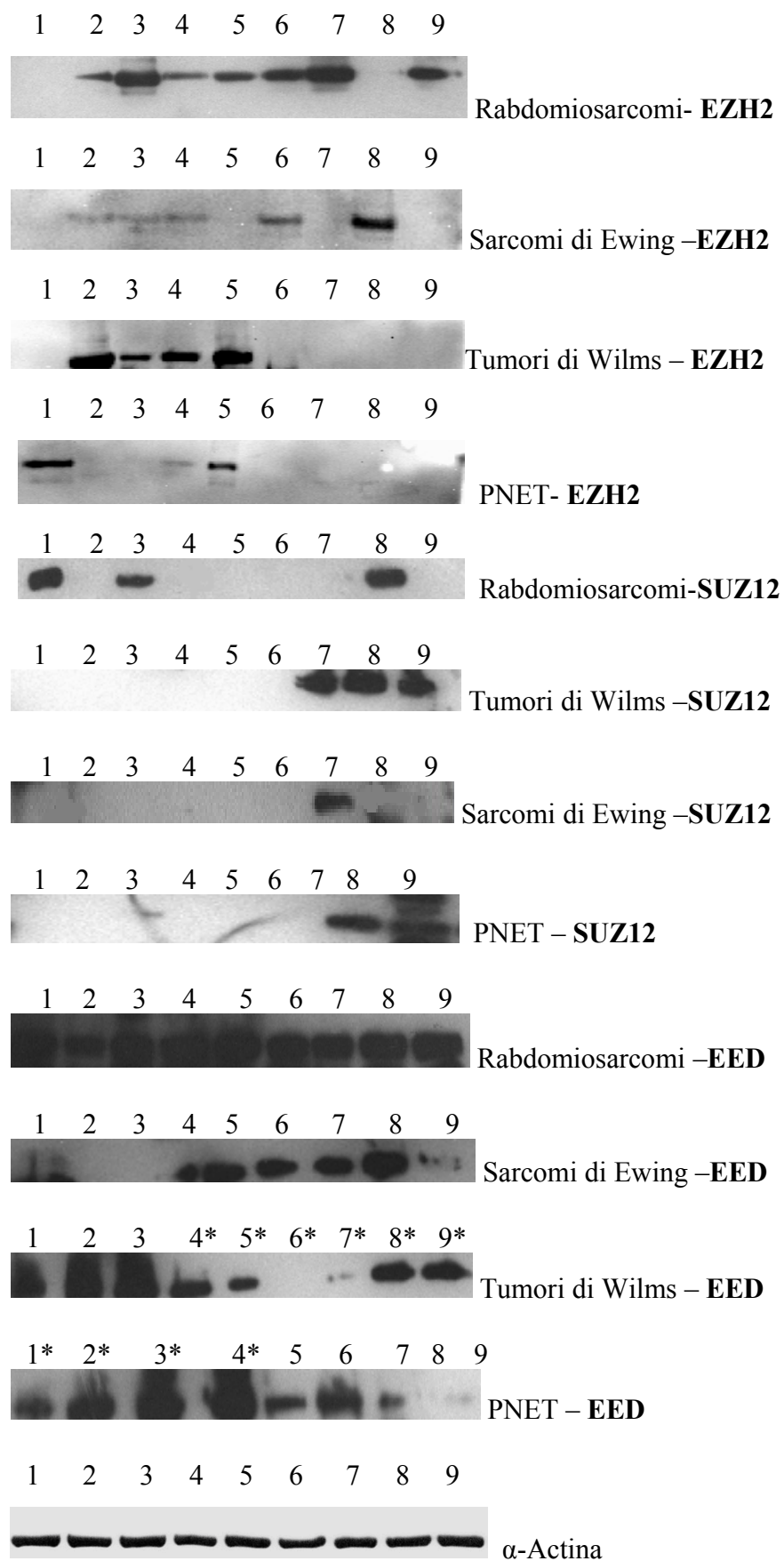


Fig.6: Espressione proteica mediante Western Blotting nei campioni di tumore solido

➤ 8.6 Espressione di EZH2 e caratteristiche cliniche nei tumori solidi

Sulla base dei dati clinici raccolti (Tabella IX), i campioni di tumore solido sono stati divisi in due gruppi a seconda se il tumore fosse localizzato al solo organo di origine oppure se presentasse metastasi in altri distretti. Tra questi due gruppi i livelli di espressione di EZH2 sono risultati mediamente più alti nei campioni metastatici (Figura 7).

Altro parametro clinico preso in esame è la ricorrenza della malattia e anche in questo caso i livelli di espressione di EZH2 risultano mediamente più alti nei pazienti con recidiva di malattia (Figura 8).

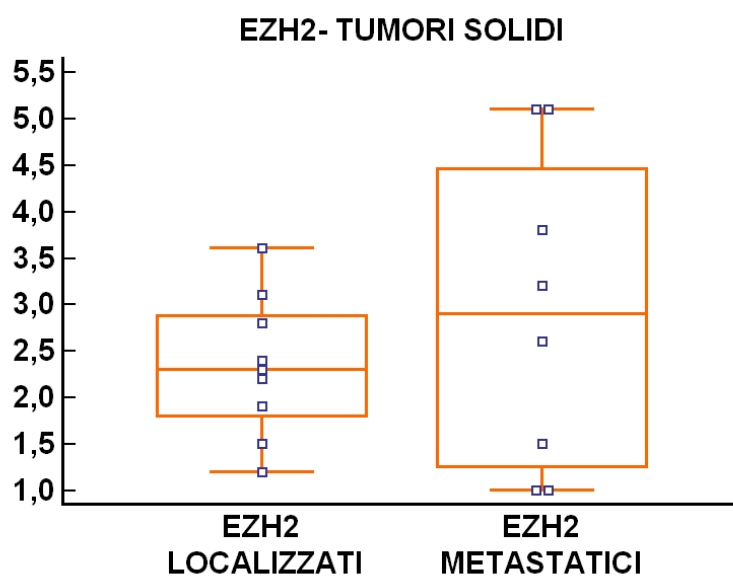


Fig. 7: analisi dell'espressione relativa di EZH2 tra i campioni di tumore solido analizzati in base alla presenza o assenza di metastasi

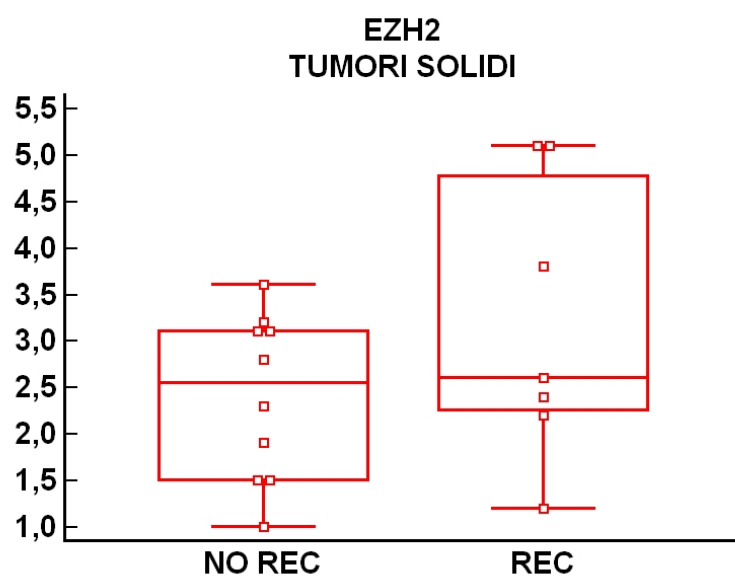


Fig. 8: analisi dell'espressione relativa di EZH2 tra i campioni di tumore solido analizzati in base alla presenza o assenza di recidiva di malattia

Tab. IX : Caratteristiche cliniche dei pazienti affetti da tumore solido

Paziente	Stadio	Localizzazione	Età (mesi)	Stato	Recidiva
RMS1	III	Collo	39	vivo	Si
RMS2	IV	Coscia dx e polmone	160	morto	Si
RMS3	IV	Parete toracica	19	vivo	No
RMS4	IV	Addome e fegato	90	vivo	Si
RMS5	IV	Polmone e vescica	87	Vivo	No
RMS6	IV	Braccio dx	13	morto	No
RMS7	II	Gamba dx	20	morto	Si
RMS8	IV	Addome	50	vivo	No
RMS9	III	Collo	40	morto	No
RMS10	IV	Gamba sx	15	morto	No
EW1	III	Gluteo dx	57	vivo	No
EW2	III	Addome	42	morto	Si
EW3	IV	Costa polmone	138	vivo	No
EW4	IV	Clavicola e scapola	110	morto	Si
EW5	IV	Fossa iliaca dx	50	morto	Si
EW6	IV	Paracerebrale	58	morto	Si
EW7	III	Femore dx	53	vivo	No
WT1	IV	Rene dx	90	vivo	No
WT2	III	Rene dx	60	vivo	No
WT3	II	Rene dx	49	vivo	No
WT4	III	Rene sx	30	morto	No
WT5	IV	Rene sx	40	morto	No
WT6	III	Bilaterale	30	morto	No
PNET1	III	Polmone	43	vivo	Si
PNET2	IV	Torace/addome	45	morto	Si
PNET3	III	Addome	50	morto	No
PNET4	IV	Scapola	120	morto	Si
PNET5	III	Polmone	90	morto	No

➤ 8.7 Espressione di NGFR e caratteristiche cliniche nei tumori solidi

I livelli di espressione di NGFR sono risultati mediamente più alti nei campioni metastatici rispetto ai campioni di tumore localizzato (Figura 9); al contrario i suoi livelli di espressione sono risultati mediamente più alti in coloro che non hanno presentato recidiva di malattia paragonati ai pazienti recidivati (Figura 10).

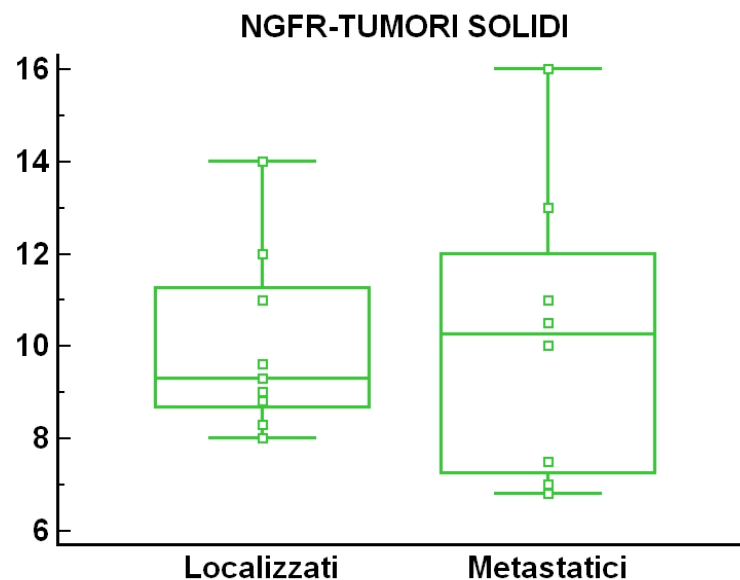


Fig. 9 : analisi dell'espressione relativa di NGFR tra i campioni di tumore solido analizzati in base alla presenza o assenza di metastasi

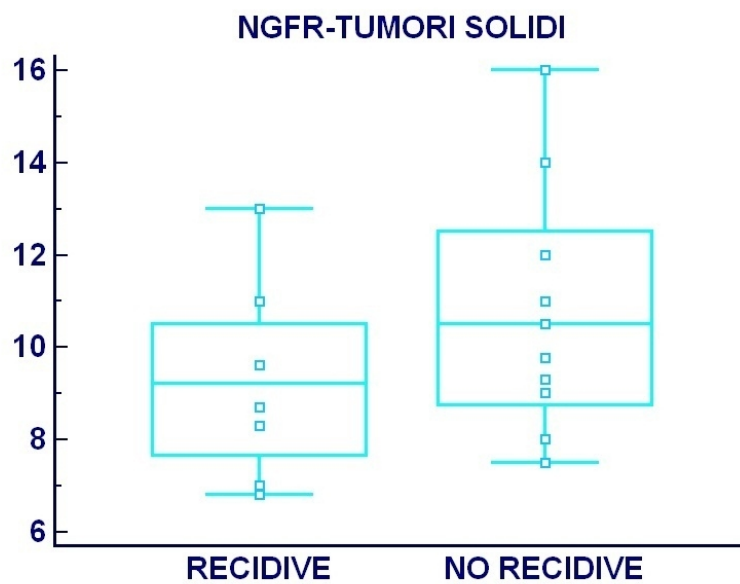


Fig. 10 : analisi dell'espressione relativa di NGFR tra i campioni di tumore solido analizzati in base alla presenza o assenza di recidiva di malattia

LLA A CELLULE T

➤ **8.8 Analisi quantitativa dei livelli di espressione dei membri di PRC2 nei campioni di LLA**

Nei campioni di leucemia analizzati e nella linea cellulare Jurkat è stato possibile riscontrare l'espressione di EZH2, SUZ12 e EED in tutti i campioni. L'analisi dei livelli di espressione dei membri del complesso PRC2 nella linea cellulare Jurkat ha evidenziato come EZH2 risulta fortemente espresso rispetto a SUZ12 e EED (Figura 10).

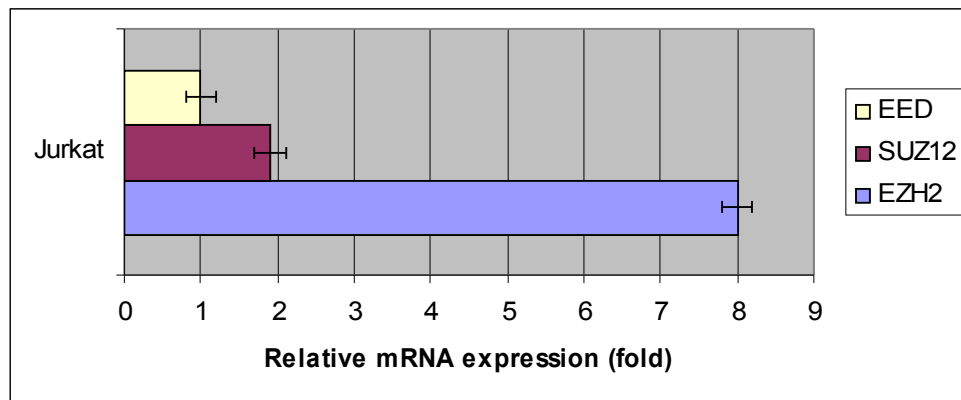


Fig.10: analisi dei livelli di espressione dei componenti del complesso PRC2 nella linea cellulare Jurkat.

L'analisi dei livelli di espressione di EZH2, SUZ12 e EED effettuata su 6 campioni di LLA di tipo T mostra dei risultati compatibili con il modello cellulare studiato, con più alti livelli di espressione per EZH2 (Figura 11).

In particolare l'analisi ha evidenziato da 0,5 a 7 volte una più alta espressione di EZH2 paragonata al campione di midollo osseo non patologico (Fig. 11a).

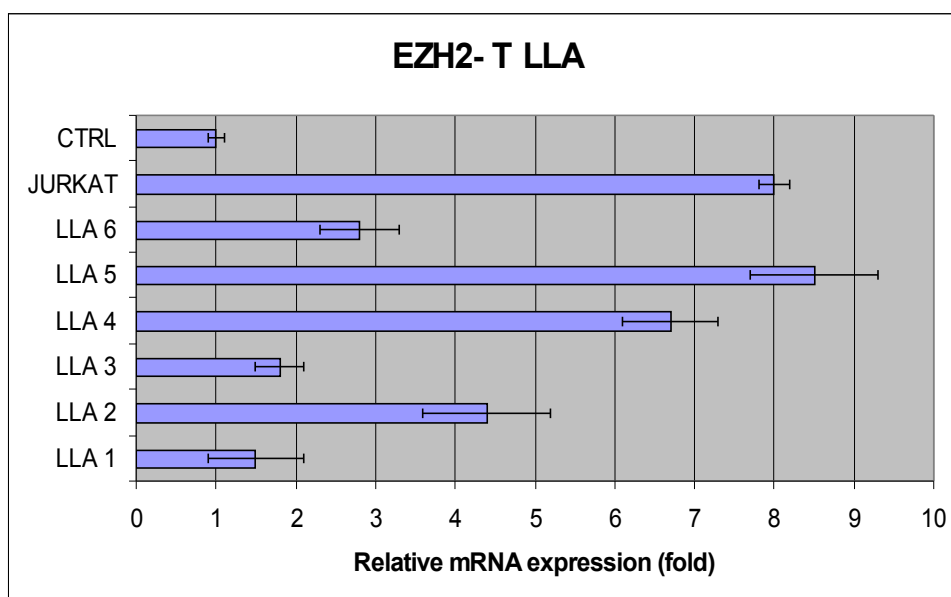


Fig.11a: analisi dei livelli di espressione di EZH2 nei campioni di T LLA.

L'analisi condotta per analizzare SUZ12 nei campioni di LLA ha evidenziato livelli di espressione pari a quelli del campione controllo ad eccezione delle cellule Jurkat che presentano una volta in più espresso SUZ12 rispetto al controllo (Fig.11b).

I livelli di espressione di EED nei campioni di LLA analizzati non presentano variazioni di espressione rispetto al campione di midollo osseo normale (Fig.11c).



Fig.11b: analisi dei livelli di espressione di SUZ12 nei campioni di T-LLA

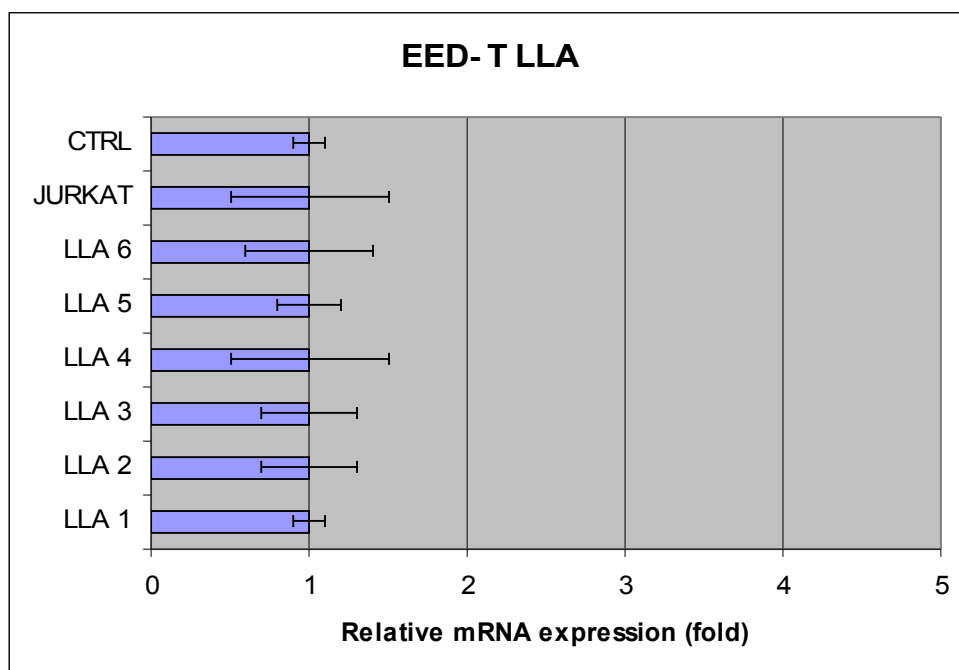


Fig.11c: analisi dei livelli di espressione di EED nei campioni di T-LLA

➤ **8.9 Analisi qualitativa dell'espressione di EZH2, SUZ12 e EED nei campioni di T-LLA**

L'analisi dell'espressione proteica dei membri del complesso PRC2 è stata eseguita, mediante Western Blotting, per i 20 campioni di LLA di tipo T e le cellule Jurkat.

Nella linea cellulare Jurkat (JCL) è stata osservata l'espressione delle proteine EZH2 e EED ma l'assenza di espressione per SUZ12 (Tabella X).

I campioni di LLA hanno mostrato l'espressione della proteina EZH2 in 16/20 (80%) campioni, la proteina SUZ12 in 12/20 (60%) mentre la proteina EED è risultata essere espressa in tutti i campioni (Tabella X – Figura 12 e 13).

Tra i 16 pazienti che esprimono la proteina EZH2, 11 sono Poor Prednisone Responder, mentre 13 presentavano valori di globuli bianchi alla diagnosi superiori a 40.000/ μ L.

Tab. X : quadro espressione proteica nei campioni di T LLA

	JCL	LLA1	LLA2	LLA3	LLA4	LLA5	LLA6	LLA7	LLA8	LLA9	LLA10
EZH2	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
SUZ12	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
EED	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

	LLA11	LLA12	LLA13	LLA14	LLA15	LLA16	LLA17	LLA18	LLA19	LLA20
EZH2	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
SUZ12	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
EED	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

JCL: Jurkat cell line; **LLA:** Leucemia Linfoblastica Acuta.

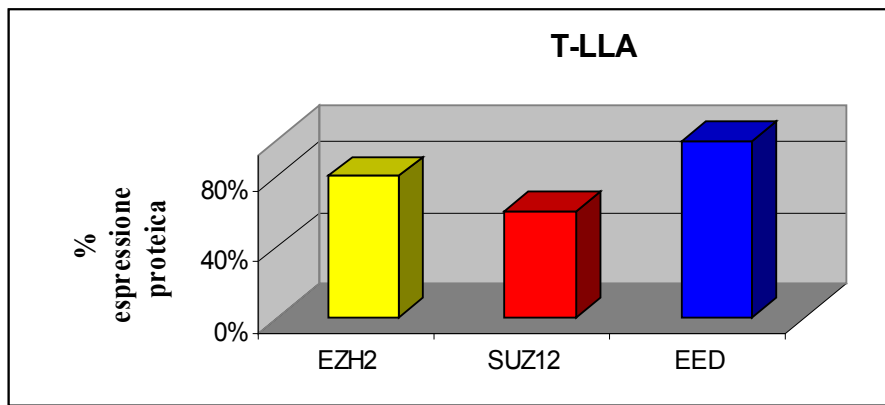


Fig.12 : percentuale di espressione delle proteine EZH2, SUZ12, EED nei campioni di T-LLA

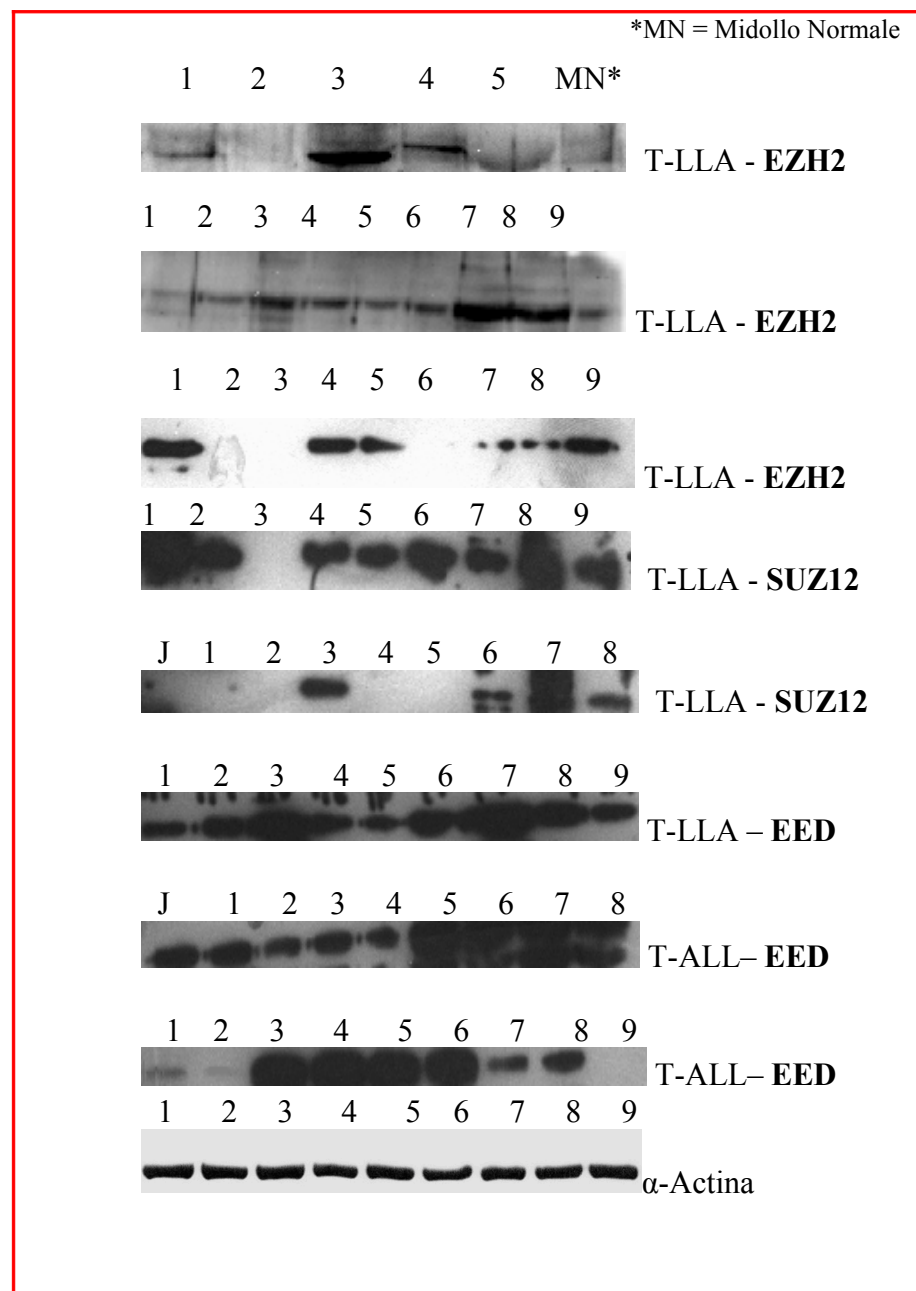


Fig. 13: analisi delle proteina del complesso PCR2 nei campioni di T-LLA

Tab. XI Caratteristiche cliniche dei 20 pazienti affetti da LLA

Paziente	Globuli bianchi alla diagnosi	Risposta al Prednisone	Stato	Recidiva
LLA1	6.700	Good Responder	Morto	Si
LLA2	3.000	Good Responder	Vivo	No
LLA3	242.700	Poor Responder	Morto	Si
LLA4	92.600	Poor Responder	Vivo	No
LLA5	172.000	Poor Responder	Morto	Si
LLA6	233.200	Poor Responder	Vivo	No
LLA7	58.000	Poor Responder	Vivo	Si
LLA8	60.000	Poor Responder	Vivo	No
LLA9	90.300	Poor Responder	Morto	No
LLA10	210.400	Good Responder	Vivo	No
LLA11	408.000	Poor Responder	Morto	Si
LLA12	218.000	Poor Responder	Vivo	No
LLA13	58.500	Poor Responder	Morto	Si
LLA14	12.700	Good Responder	Vivo	No
LLA15	72.200	Poor Responder	Morto	Si
LLA16	90.500	Poor Responder	Vivo	No
LLA17	197.800	Good Responder	Vivo	No
LLA18	107.600	Good Responder	Vivo	No
LLA19	86.100	Good Responder	Vivo	No
LLA20	130.000	Poor Responder	Morto	Si

➤ 8.10 Interazione tra EZH2 e il gene INK4a

Le proteine p16 e p14, due importanti regolatori del ciclo cellulare e della senescenza, sono codificati entrambi dal locus INK4a-ARF e rappresentano due tumor suppressor che agiscono a monte dei pathway di RB e p53.

L'interazione tra EZH2 e il promotore del gene INK4a è stata studiata mediante la tecnica dell'immunoprecipitazione cromatinica che è stata eseguita sulla linea cellulare Jurkat e sulle cellule di 2 pazienti pediatrici affetti da LLA a cellule T che sono state poste in coltura.

La metodica ha previsto l' utilizzo di un cocktail di enzimi per il taglio della cromatina, ma il tempo di azione varia a seconda della linea cellulare testata. Le dimensioni ottimali, per la cromatina sottoposta a taglio enzimatico, sono tra 200-1500 bp e il tempo di azione ottimale è risultato di 10 minuti per i 3 campioni analizzati. Prima di procedere con la immunoprecipitazione, è stato necessario verificare che la cromatina fosse stata tagliata correttamente visualizzandola su gel di agarosio al 1% (Figura 14).

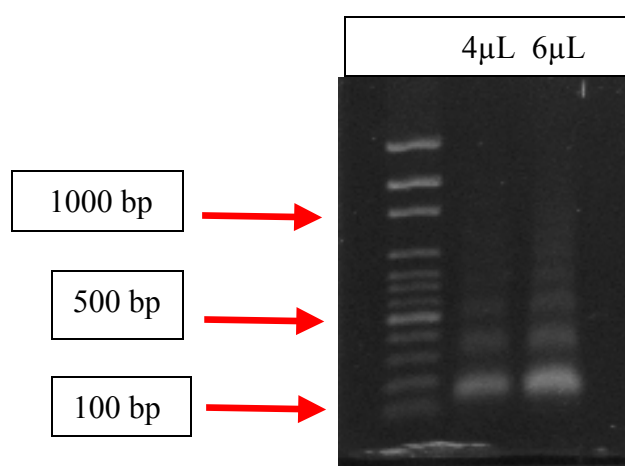


Figura 14: Taglio della cromatina dopo 10 minuti di incubazione con cocktail enzimatico.

L'analisi di immunoprecipitazione cromatinica effettuata sulla linea cellulare Jurkat, utilizzando una coppia di primer disegnati nella regione del promotore

del gene INK4a (402 bp) non ha permesso di visualizzare l'amplificato (Figura 15).

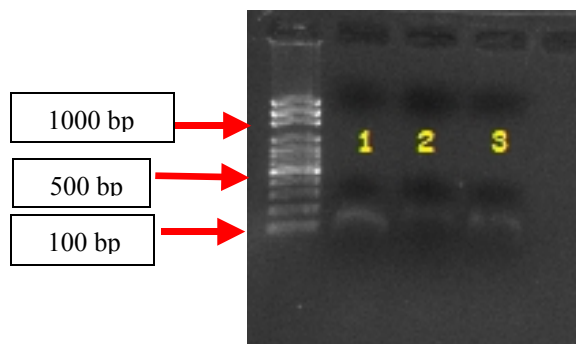


Fig. 15: gel d'agarosio 1% per visualizzare i prodotti di PCR con i primer per INK4a. **1:** DNA cellule Jurkat; **2:** ChIP cellule Jurkat; **3:** Input cellule Jurkat

Come controllo positivo, gli stessi campioni sono stati amplificati con una coppia di primers per una regione del gene $G\gamma$, (670 bp) ed è stato possibile visualizzare gli amplificati (Figura 16).

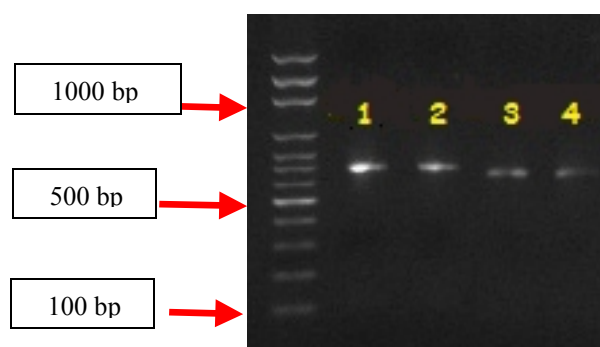


Fig.16: gel d'agarosio 1% per analizzare i prodotti di PCR con primer per il gene housekeeping ($G\gamma$)
1-2: DNA cellule Jurkat; **3:** ChIP cellule Jurkat;
4: Input cellule Jurkat;

L'analisi di immunoprecipitazione cromatinica è stata eseguita anche sui linfoblasti di due pazienti pediatrici affetti da LLA di tipo T.

Utilizzando i primers per la regione del promotore di INK4a, l'amplificato è stato visualizzato solo per il campione Input (Figura 17).

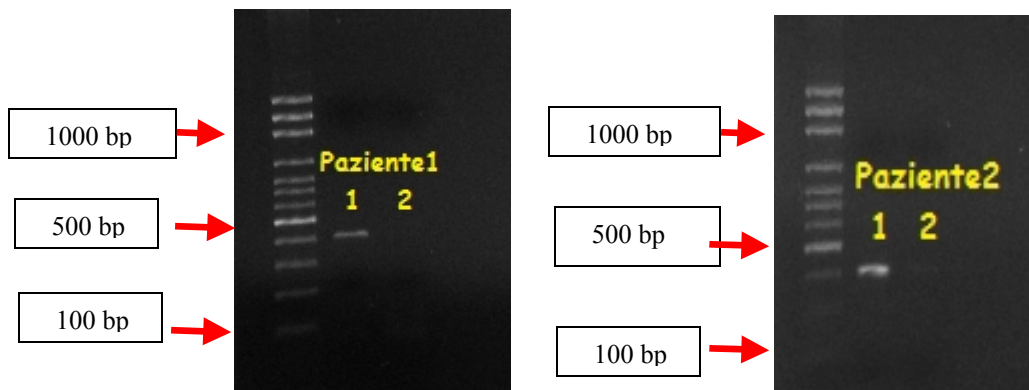


Fig.17: gel d'agarosio 1% per visualizzare i prodotti di PCR con i primer per INK4a. **1:** Input cellule dei Pazienti; **2:** ChIP cellule dei Pazienti.

Anche per i campioni di LLA è stata eseguita l'amplificazione dei campioni Input e ChIP del Paziente1 e il Paziente2 con i primers per un gene housekeeping, visualizzando un amplificato sia per l'Input che per il campione ChIP (Figura 18).

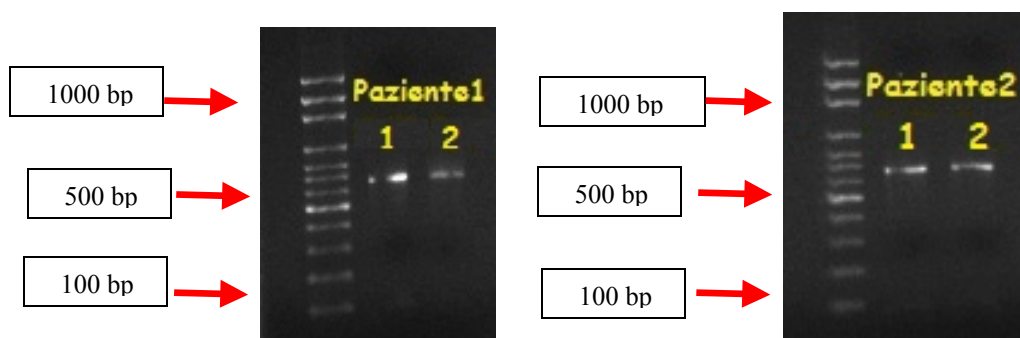


Fig.18: gel d'agarosio 1% per analizzare i prodotti di PCR con primer per il gene housekeeping (G γ)
1: ChIP dei pazienti LLA; **2:** Input dei pazienti LLA

CAPITOLO 9

DISCUSSIONE

Delle numerose proteine che agiscono sulla struttura della cromatina per regolare l'espressione genica, EZH2 negli ultimi anni, è stato considerato uno dei più interessanti tra i target epigenetici per la terapia dei tumori nell'uomo.

I risultati ottenuti circa la sua maggiore espressione nei campioni di RMS analizzati sono in accordo con uno studio in cui la sua overespressione era considerata come uno degli eventi iniziali di trasformazione neoplastica nei sarcomi dei tessuti molli.(35)

Inoltre recentemente è stato osservato che la maggiore espressione di EZH2 nei Rabbdomiosarcomi porterebbe al silenziamento di specifici geni che inibiscono il normale differenziamento dei mioblasti.(36)

I dati ottenuti circa l'espressione nei sarcomi di Ewing concordano con uno studio in cui EZH2 risultava più espresso a differenza di SUZ12 e EED che non presentavano un alterata espressione.(22)

I campioni di tumore di Wilms analizzati hanno presentato un aumento di espressione di EZH2 che in alcuni casi risultava davvero notevole; tale dato si rivela ancora più interessante poiché in letteratura l'unico studio inerente è stato effettuato principalmente su modello murino.(37)

EZH2 regola negativamente diversi geni coinvolti nel differenziamento neuroectodermale ed endoteliale mentre aumenta l'espressione di geni che conferiscono caratteristiche di staminalità a questi tumori di origine embrionale.(22) Sulla base di tale aspetto è stato evidenziato il notevole aumento di espressione di NGFR in tutti i campioni di tumore solido analizzati, spiegando in parte le caratteristiche di staminalità tipiche di queste

neoplasie. Sulla base dei risultati ottenuti si evince l'associazione tra i livelli di espressione di EZH2 e NGFR con la presenza di metastasi alla diagnosi indicando un ruolo importante nella maggiore aggressività del tumore collegata con la riduzione delle percentuali di sopravvivenza. Tali risultati sono consistenti con uno studio che associava la maggiore espressione di EZH2 con l' invasività delle cellule di tumore alla mammella e alla prostata. (38)

Inoltre la maggiore espressione di EZH2 nei campioni analizzati risulta associata alla ricorrenza di malattia supportando la teoria per cui, inducendo e sostenendo le caratteristiche di staminalità, svolga un ruolo importante nel ripresentarsi della neoplasia.

Relativamente ai campioni di leucemia a cellule T, gli alti livelli di EZH2 riscontrati inducono a ritenere promettente l'utilizzo di inibitori specifici per il trattamento delle LLA pediatriche. Tale dato risulta innovativo poiché in letteratura sono presenti soprattutto studi riguardanti la leucemia mieloide. (39, 40) Al contrario uno studio che otteneva l' induzione della leucemia con la distruzione di Ezh2 in topo, contrastava con l'idea più diffusa secondo cui sia la maggiore espressione di EZH2 a giocare un ruolo importante nello sviluppo del tumore.(41) Inoltre l' analisi ChIP non ha evidenziato una regolazione di EZH2 sulla regione analizzata di INK4a nei due campioni alla diagnosi di LLA a cellule T; non si può escludere che tale regolazione si possa verificare in una fase successiva della malattia e soprattutto nei pazienti che rispondono meno alla terapia. Contrariamente uno studio effettuato su fibroblasti (17) aveva mostrato la presenza delle proteine polycomb e quindi anche di EZH2, a livello del promotore di INK4a, impedendo la sua attivazione e bloccando la senescenza di tali cellule. Il dato ottenuto mediante

l'analisi ChIP è comunque in accordo con uno studio (42) che ha evidenziato la delezione di p16 nel 70% di LLA a cellule T.

Questi dati divergenti richiedono l'attuazione di maggiori studi che possano chiarire sempre di più un sistema di regolazione così complesso.

CAPITOLO 10

CONCLUSIONI

Il silenziamento epigenetico degli oncosoppressori nel cancro ha ispirato potenziali strategie terapeutiche che utilizzano inibitori degli enzimi epigenetici.

EZH2, a causa della sua alterata espressione in diversi tipi di tumore (5,43), in cui risulta fortemente iperespresso, sta emergendo come un bersaglio chiave nell'ambito della terapia epigenetica per il cancro.

I risultati ottenuti mostrano un aumento dei livelli di espressione di EZH2 sia nei tumori solidi pediatrici analizzati che nelle LLA di tipo T rispetto ai campioni utilizzati come controllo.

Nessuna variazione di espressione rispetto al controllo è stata invece osservata per SUZ12 e EED forse in relazione alla loro funzione prevalentemente strutturale.

È suggestivo osservare che i dati ottenuti sui livelli di EZH2 erano mediamente più alti nei campioni di tumore solido metastatici rispetto ai tumori di tipo localizzato.

Oltre alla presenza di metastasi, nei campioni di tumore solido, i livelli di EZH2 sono risultati mediamente più alti nei campioni che avevano presentato recidiva di malattia.

NGFR, marker essenziale delle cellule staminali neuro-ectodermiche, è risultato con livelli molto alti rispetto al controllo nei campioni analizzati in cui EZH2 è iperespresso.

L'analisi di immunoprecipitazione cromatinica eseguita sulla linea cellulare Jurkat ha evidenziato l'assenza della regione del promotore del gene INK4a

presa in esame. I risultati ottenuti dai linfoblasti estratti da pazienti pediatrici affetti da LLA a cellule T hanno invece permesso di verificare la presenza della regione studiata ma non il legame di EZH2; infatti solo per i campioni Input è stato visualizzato l'amplificato.

I risultati ottenuti risultano interessanti per diversi motivi:

1) i livelli di espressione di EZH2 nelle cellule dei tessuti differenziati sono normalmente bassi quindi una iperespressione di EZH2 potrebbe rinforzare o favorire, in progenitori quiescenti o in cellule più differenziate, uno stato aggressivo con caratteristiche riconducibili alla condizione di staminalità.

2) I tumori in stadio avanzato presentano un alto contenuto di “cancer stem cell”, per questo è stato proposto che la ricorrenza della malattia potrebbe derivare dalla popolazione di cancer stem cell primarie che hanno acquisito nuove mutazioni genetiche guidando la progressione del cancro.(44) Anche nei tumori pediatrici, con la loro origine embrionale, gli alti livelli di espressione di EZH2 e NGFR supportano la teoria della cellula staminale tumorale spiegando la possibile ricomparsa della neoplasia.

Ulteriori studi circa il contributo della deregolazione epigenetica nella patogenesi del cancro nei bambini potrebbero fornire altri dati circa il ruolo della instabilità epigenomica per ottenere una effettiva terapia epigenetica mirata.

BIBLIOGRAFIA

1. Portela A, Esteller M
Epigenetic modifications and human disease
Nature biotechnology. (2010), 28: 1057-1068
2. Pang-Kuo L, Saraswati S
Epigenomics and breast cancer
Pharmacogenomics. (2008), 9: 1879–1902
3. Margueron R, Reinberg D
The Polycomb complex PRC2 and its mark in life
Nature. (2011), 469: 343-3
4. Shen X, Liu Y, Hsu Y, Fujiwara Y, Kim J, Mao X, Yuan G, Orkin S
EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. Mol Cell. (2008), 32: 491–502
5. Hyun Yoo K, Hennighausen L.
EZH2 methyltransferase and H3K27 methylation in breast cancer.
Int. J Biol. Sci. (2012), 8: 59-65.
6. Jones P, Baylin S.
The Epigenomics of Cancer. Cell. (2007), 128: 683- 692.
7. Chang CJ, Hung MC.
The role of EZH2 in tumour progression.
British J of Cancer. (2012), 106: 243-247.
8. Piunti A, Pasini D.
Epigenetic factor in cancer development: polycomb group proteins.
Future Oncol. (2011), 7: 57-75.
9. Chang CJ, Yang JY, Xia W, Chen CT, Xie X, Chao CH, Woodward WA, Hsu JM, Hortobagyi GN, Hung MC.
EZH2 promotes expansion of breast tumor initiating cells through activation of RAF1-beta-catenin signalling.
Cancer Cell. (2011), 19: 86-100.

10. Varambaly S, Dhanasekaran S.M, Zhou M, Barrette T.R, Sanda M.G, Ghosh D, Pienta K, Sewalt R, Otte A, Rubin M, Chinnaiyan A. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*. (2002), 419: 624-629.

11. Collett K, Eide G, Arnes J, Stefansson J, Straume O, Akslen L. Expression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer. *Clin Cancer Res*. (2006), 12: 1168-1174.

12. Su IH, Dobenecker MW, Dichinson E, Oser M, Basavaraj A, Marqueron R, Viale A, Reinberg D, Wulfig C, Tarakhovsky A. Polycomb group protein ezh2 controls actin polymerization and cell signaling. *Cell*. (2005), 121: 425-436.

13. Bryant RJ, Winder SJ, Cross SS, Hamdy FC, Cunliffe VT. The Polycomb group protein EZH2 regulates actin polymerization in human prostate cancer cells. *Prostate*. (2008), 68: 255-263.

14. Bryant RJ, Cross NA, Eaton CL, Hamdy FC, Cunliffe VT. EZH2 promotes proliferation and invasiveness of prostate cancer cells. *Prostate*. (2007), 67:547-556.

15. Richter G, Plehma S, Fasana A, Rosslera S, Unlandb R, Bennani-Baitid I, Hotfilderc M, Lowela D, von Luettichaua I, Quintanilla-Martinez L, Kovard H, Staegelf M, Muller-Tidowb C, Burdach S, Mossbrugger I. EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation. *PNAS*. (2009), 106: 5324-5329.

16. Fujii S, Ito K, Ito Y, Ochiai A. Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) down-regulates RUNX3 by increasing histone H3 methylation. *J Biol Chem*. (2008), 283:17324-32

17. Bracken A, Kleine-Kohlbrecher D, Dietrich N, Pasini D, Gargiulo G, Beekman C, Theilgaard-Monch K, Minucci S, Porse B, Marine J, Hansen K, Heilin K. The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes & Development*. (2007), 21: 525-530.

18. Lee J, Son MJ, Woolard K, Donin NM, Li A, Cheng CH, Kotliarova S, Kotliarov Y, Walling J, Ahn S, Kim M, Totonchy M, Cusack T, Ene C, Ma H, Su Q, Zenklusen JC, Zhang W, Maric D, Fine HA. Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells. *Cancer Cell*. (2008), 13: 69-80.

19. Cao Q, Yu J, Dhanasekaran SM, Kim JH, Mani RS, Tomlins SA, Mehra R, Laxman B, Cao X, Kleer CG, Varambally S, Chinnaiyan AM. Repression of E- Cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. *Oncogene*. (2008), 27: 7274-7284.

20. Min J, Zaslavsky A, Fedele G, McLaughlin SK, Reczek EE, De Raedt T, Guney I, Strohlic DE, Macconail LE, Beroukhim R, Bronson RT, Ryeom S, Hahn WC, Loda M, Cichowski K. An oncogene suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by co-ordinately activating Ras and nuclear factor-kappaB. *Nat. Med*. (2010), 16: 286-294.

21. Lu C, Han HD, Mangala LS, Ali-Fehmi R, Newton CS, Ozbun L, Armaiz-Pena GN, Hu W, Stone RL, Munkarah A, Ravoori MK, Shahzad MM, Lee JW, Mora E, Langley RR, Carroll AR, Matsuo K, Spannuth WA, Schmandt R, Jennings NB, Goodman BW, Jaffe RB, Nick AM, Kim HS, Guven EO, Chen YH, Li LY, Hsu MC, Coleman RL, Calin GA, Denkbass EB, Lim JY, Lee JS, Kundra V, Birrer MJ, Hung MC, Lopez-Berestein G, Sood AK. Regulation of tumor angiogenesis by EZH2. *Cancer Cell*. (2010), 18: 185-197.

22. Burdach S, Plehm S, Unland R, Dirksen U, Borkhardt A, Staeger M, Muller-Tidow C, Richter G. Epigenetic maintenance of stemness and malignancy in peripheral neuroectodermal tumors by EZH2. *Cell Cycle*. (2009), 8: 1991-1996.

23. Pizzo P, Poplack D. Principles and Practice of pediatric oncology/ sixth edition Lippincott Williams & Wilkins.

24. Paolucci G, Vecchi V. Oncologia Pediatrica / seconda edizione Società editrice Esculapio.

25. Pui CH, Relling MV, Downing JR.
Acute lymphoblastic leukemia.
N Engl J Med. (2004), 350:1535-1548.

26. Pui CH., Mary V. Relling ,Dario Campana, William E. Evans.
Childhood Leukemia. (2006) Reviews in Clinical and
Experimental Hematology, vol 6.

27. Pui CH, Robison LL, Look AT.
Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet. (2008), 371:1030-43.

28. Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G,
Galton DA, Gralnick HR, Sultan C.
Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-
American-British cooperative group.
Br J Haematol Aug. (1976), 33: 451-458.

29. Smith M. Considerations on a possible viral etiology for B-
precursor acute lymphoblastic leukemia of childhood.
J Immunother. (1997), 20: 89-100.

30. Greaves MF. Speculations on the cause of childhood acute
lymphoblastic leukaemia. Leukemia. (1988), 2: 120-125.

31. Wiemels J. Perspectives on the causes of childhood leukemia.
Chemico Biol Interac. (2012), 196: 59-67.

32. Moorman AV. The clinical relevance of chromosomal and genomic
abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia.
Blood Rev. (2012), 26:123-35.

33. Mullighan CG. Molecular genetics of B-precursor acute
lymphoblastic leukemia. J Clin Invest.(2012), 122:3407-15.

34. McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van
Aller G, Yan Liu Y, Graves AP, Della Pietra A, Diaz E, La France LV,
Mellinger M, Duquenne C, Tian X, Kruger RG,McHugh CF, Brandt
M, Miller MW, Dhanak D, Verma SK, Tummino PJ,Creasy C.

EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature*. (2012), 492: 108-112.

35. Siddiqi S, Mills J, Matushansky I. Epigenetic remodelling of chromatin architecture exploring tumor differentiation therapies in mesenchymal stem cells and sarcomas. *Curr Stem Cell Res Ther*. (2010), 5:63-73.
36. Marchesi I, Fiorentino FP, Rizzolio F, Giordano A, Bagella L. The ablation of EZH2 uncovers its crucial role in rhabdomyosarcoma formation. *Cell Cycle*(2012), 11:3828-36.
37. Metsuyanin S, Pode-Shakked N, Schmidt-Ott KM, Kesht G, Rechavi G, Blumental D, Dekel B. Accumulation of malignant renal stem cells is associated with epigenetic changes in normal renal progenitor genes. *Stem Cells*. (2008), 26: 1808-17
38. Simon JA, Carol AL. Role of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutation Research*. (2008), 647: 21-29.
39. Shi J, Wang E, Zuber J, Rappaport A, Taylor M, Johns C, Lowe SW, Vakoc CR. The Polycomb complex PRC2 supports aberrant self-renewal in a mouse model of MLL-AF9;Nras(G12D) acute myeloid leukemia. *Oncogene*. (2013), 32: 930-938
40. Ernst T, Pflug A, Rinke J, Ernst J, Bierbach U, Beck J F, Hochhaus A, Gruhn B. A somatic EZH2 mutation in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia* (2012), 26: 1701-3.
41. Hock H. A complex Polycomb issue: the two faces of EZH2 in cancer. *Genes Dev*. (2012), 26: 751-5.
42. Mullighan CG, Miller CB, Radtke I. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature*. 2008; 453:110–114.
43. Karanikolas B, Figueiredo M, Wu L. Polycomb group protein enhancer of zeste 2 is an oncogene that promotes the neoplastic transformation of a benign prostatic

epithelial cell line. *Mol. Cancer Res.* (2009), 7:1456-1465.

44. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cell in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer.* (2008), 8:755-768.